Acta Haematologica

International Journal of Haematology   Journal International d'Hématologie   Internationale Zeitschrift für Hämatologie

Editores-in-Chief: H. Lüdin, Basel, und G. Rosenow, New York

Organe Officiel de la Société Européenne d'Hématologie

1965

BASEL (Schweiz)   S. KARGER   NEW YORK

Contents – Sommaire – Inhaltsverzeichnis

Vol. 34

ADAR, H. vide SADAN, N

AKSOY M. AND ERDEM, S. (Istanbul):

The Thalassaemia Syndromes. V Cooley' Anaemia with Low Level of Fetal Haemoglobin. A Genetic Study in Four Families 291

ALA, F A. AND SHEARMAN D J C. (Edinburgh)

A Case of Autoimmune Haemolytic Anaemia, Thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré Syndrome 361

ANDERSEN S. B. (Copenhagen):

Metabolism of γG-Globulin in Chronic Leukaemia 44

ANTONIOLI, J.A. BARR, A. ET VANNOTTI, A. (Lausanne)

Les phosphatases leucocytaires alcaline et acide Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques 129

ARCASOY A.: vide OKÇUOĞLU A.

BACHMANN, F: vide FRICK, P G.

BARR, A.: vide ANTONIOLI, J A.

BELFIORE, F MELDOLESI, J AND CALCARA, G (Catania):

Erythrocyte Enzymes in Thalassaemia and Thalassodrepanocytosis 329

BELL, W N vide THOMPSON, R. B.

BICANOVÁ, J: vide BRABEC, V

BRABEC, V BICANOVÁ, J FRIEDMANN, B. KOUT M. MIRČEVOVÁ, L.; PALEK, J VOPATOVÁ, M. UND VOLEK, V (Prag)

Stoffwechselveränderungen in Erythrozyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit 86

BRUNNER, H. E. (Zurich):

Die Osteomyelofibrose. Untersuchung der Ferro- und Erythrozytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom 257

BORGMANN, W vide KLEINE, N.

BORGATTI, L. vide INTROZZI, P

CALCARA, G vide BELFIORE, F

CARRARA, P M. vide PONTI, G. B.

CATALDO, F DE (Milano)

Acquired Idiopathic Hypoprothrombinaemia. Acquired Hypoprothrombinaemia Secondary to Selective Deficient Absorption of Vitamin K 167

CLOTTEN, R.: vide HEILMEYER, L.

CLOTTEN, R. vide HEMPEL, H.

COLONNA, A.: vide GRIGNANI, F

CSERHÁTI, I. vide RÁK, K.

EFRATI, P vide SADAN, N

EMERY J L. vide KALPAKTSOGLOU, PITSA, K.

ERDEM, S, vide AKSOY M.

ERDANI, S. vide PONTI, G B.

FESSAS, PH. AND PAPAYANNOPOULOU, TH. (Athens)

Cytochemical Observations on β-Thalassaemia. I. The PAS Positive Substance of Erythroblasts 1

FRICK, P G. BACHMANN, F UND SCHMID, J R. (Zürich)

Eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangels 215

FRIEDMANN B. vide BRABEC, V

GANDONE, A. UND RICOVERNO, F (Zürich)

Hämolytische Krise bei Mangel an Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation 338

Gorini, P vide Rondanelli, E. G.

Götz, H. vide Scheiffarth, F

Gramlich, F vide Müller, H. E.

Grignani, F ; Martelli, M.; Tonato, M. and Colonna, A. (Perugia)
Studies on the Tetrahydrofolic Acid Dependent Enzyme System in Human Leukocytes 72

Harms, D and Sachs, H. (Kiel)
Familial Chronic Thrombocytopenia with Platelet Autoantibodies 30

Heilmeyer, L. und Clotten, R. (Freiburg im Br)
Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Güntherschen Porphyria congenita 65

Heilmeyer, L. vide Hempel, H.

Hempel, H. Clotten, R. und Heilmeyer, L. (Freiburg im Br)
Untersuchungen über die Haemsynthese in roten Blutzellen 193

Hochman, A. vide Robinson, E.

Huber, H. Lewis, S. M. und Szur, L. (Innsbruck/London)
Die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien 116

Introzzi, P Buscarini, L. et Notario, Antonia (Pavia)
Altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myélose érythrémique aiguë 277

Kalpaktsoglou, Pitsa, K. and Emery J. L. (Athens)
Human Bone Marrow During the Last Three Months of Intrauterine Life 228

Kleine, N und Borgas, W (Freiburg im Br)
Die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich 51

Klemm, D. vide Schubothe, H.

Kout M. vide Brabec, V

Kriza, F vide Rák, K.

Lewis, S. M. vide Huber, H.

Lutz, H. vide Scheiffarth, F

Magliulo, E. vide Rondanelli, E. G.

Martelli, M. vide Grignani, F

Meldolesi, J vide Belfiore, F

Minnich, Virginia vide Okçuoğlu, A.

Mirčevová, L. vide Brabec, V

Müller, H. E. und Gramlich, F (Mainz)
Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrozyten 239

Notario, Antonia. vide Introzzi, P

Odom, J vide Thompson R. B.

Okçuoğlu, A. Minnich, Virginia and Arcasoy A. (Ankara)
A Further Example of Thalassemia-Hemoglobin E Disease in Turkey 354

Palek, J vide Brabec, V

Papayannopoulou, Th. vide Fessas, Ph.

Ponti, G. B.; Valentini, R. Carrara, P M. and Eridani, S. (Milan)
Investigations on the Chromosome Complement in Some Myeloproliferative Disorders 36

Raju, S. vide Schubothe, H.

Rák, K Kriza, F ; Varga, L. und Cserháti, I. (Szeged)
Untersuchung der Thrombocytopoese bei Perniciosa-Kranken 175

Rau, P J vide Thompson, R. B.

REWALD, E. AND SCHWGAR, F. (Mar del Plata)
Substitutive-Inhibitory Gamma Globulin Therapy as Prevention of Still-birth in Rh-Incompatibility 209
RHOMBERG, F.: vide GASMORI, A.
ROSENOW, E. AND HOCHMAN, A. (Jerusalem):
The Effect of Typhoid Vaccine Injection of Partial Body Irradiated Rats 301
RONDANELLI, E. G.; GORINI, P. AND MAGLIULO, E. (Pavia)
Chloramphenicol and Erythropoiesis 321
ROZENSZAJN, L.: vide SADAN, N.
SACHS, H.: vide HARON, D.
SADAN, N.; YAFFE, D.; ROZENSZAJN, L.; ADAR, H.; SOROKKER, B. AND EFRATI, P. (Hadera/Rehovoth)
Cytochemical and Genetic Studies in Four Cases of Chediak-Higashi-Steinbrinck Syndrome 20
SCHEIFFARTH, F.; GÖTZ, H. UND LOTZ, H. (Erlangen)
Zur Charakterisierung von Myelomproteinen und Makroglobulinen 144
SCHMID, J. R.: vide FRICK, P. G.
SCHUBOTHE, H.; RAJU, S. UND KLEMM, D. (Freiburg im Br.):
Untersuchungen über kältelabile und wärmelabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien 160
SHEARMAN, D. J. C.: vide ALA, F. A.
SOROKKER, B.: vide SADAN, N.
SCHWGAR, F.: vide REWALD, E.
STUR, L.: vide HUBER, H.
THOMPSON, R. B.; RAU, P. J.; ODOM, J. AND BELL, W. N. (Jackson, Miss.):
The Sickling Phenomenon in a White Male Without Hb-S 347
TONATO, M.: vide GREGORANI, F.
VALENTINI, R.: vide PONTI, G. B.
VANNOTTI, A.: vide ANTONIOLI, J.A.
VARGA, L.: vide RÁK, K.
VOLEK, V.: vide BRABEC, V.
VOPATOVÁ, M.: vide BRABEC, V.
VREEKER, R.A. DE (Louvain)
A Technique for Routine Evaluation of Plasminogen in Humans During Streptokinase Therapy 305
WITSCHI, H. (Berne)
Desorption of Some Toxic Heavy Metals from Human Erythrocytes in vitro 101
YAFFE, D.: vide SADAN, N.
NECROLOGIA 371
LIBRI 127, 250
VARIA 64, 128, 370
SUMMARIES 16, 27, 33, 42, 49, 62, 70, 85, 98, 114, 124, 140, 156, 173, 185, 191, 206, 213, 223, 236, 247, 274, 289, 298, 304, 318, 327, 334, 345, 352, 358, 367
INDEX RERUM ad Vol. 34 372
INDEX AUTORUM ad Vol. 34 379

Printed in Switzerland by Buchdruckerei Aargauer Tagblatt AG., Aarau
Clichés: Steiner & Co AG, Basel

Acta haemat. 34: 1–19 (1963)

From the Department of Clinical Therapeutics, University of Athens,
School of Medicine, Athens (Dir.: Prof. B. Malamos)

Cytochemical Observations on β Thalassaemia

I. The PAS Positive Substance of Erythroblasts

By Phaedon Fessas and Thalia Papayannopoulou

By the application of cytochemical methods three major abnormalities have been demonstrated in the erythroblasts and to a smaller extent in the erythrocytes of thalassaemia: 1) the deposition of large amounts of iron containing material (1); 2) the accumulation of a PAS** positive substance (2, 3); 3) the presence of haemoglobin precipitates (4). It is now widely accepted (5) that typical thalassaemia is due to an inherited inability to synthesize sufficient β-chains of the normal adult haemoglobin molecule. Of the above cytochemical abnormalities, the first and the last are directly related to this defect of haemoglobin synthesis. Deposition of excess iron is a phenomenon not unique for thalassaemia: it occurs in many conditions in which haemoglobin synthesis is impaired at various levels owing to genetic or non-genetic causes (6). As for the haemoglobin precipitates, they have been considered as being formed by α-chains which have remained uncombined because of the shortage of the complementary β-chains (4, 7); again, this is not a unique situation and an excess of β-, γ- and δ-chains is observed in the α-chain thalassaemias (8).

The presence of a PAS positive substance, however, cannot be interpreted so easily. Obviously, our concepts on thalassaemia will remain incomplete – and may even need revision – in case this major cytochemical abnormality cannot be integrated rationally into the accepted scheme of pathophysiology of this disease. For this reason we thought it necessary to reexamine the question of

Supported by Grant No. HE-04541 of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

** PAS = Periodic Acid Schiff.

the PAS positive material in thalassaemic erythroblasts, the more so because the first description of this abnormality antedates the newer findings on thalassaemia.

Material and Methods

The study was carried out on freshly prepared blood and bone marrow smears of β-thalassaemia homozygotes, β-thalassaemia combinations with haemoglobin S E and Pylos and on bone marrow smears from cases with β-thalassaemia trait. One case of homozygous Hb S disease and one case of haemoglobinopathy H were also studied. For comparison sake patients with iron deficiency anaemia, other haematological disorders and some normal new borns were included.

The diagnosis was established in each case by the application of all methods currently applied in this laboratory for the study of thalassaemia and haemoglobinopathies. Therefore only the cytochemical techniques will be given in detail.

PAS reaction (9a) Preparation of solutions. 1 The solution of periodic acid (Perjod säure cryst. FLUKA"), 1 in distilled water was prepared just prior to use; 2. Reducing bath 6 ml of a 10% aqueous solution of $Na_2S_2O_5$ was mixed with 5 ml of N HCl and made up to 100 ml with distilled water this was prepared immediately before use 3. Schiff' reagent 1 gr of basic fuchsin (fuchsin-Para C. I 676, HARLECO") was dissolved in 200 ml of boiling distilled water The solution was cooled to 50° and filtered. Twenty ml of N HCl were added to the filtrate. The solution was cooled to 25°C, 1 gr of $Na_2S_2O_5$ was added and was kept in the dark for 14 or 24 hours at room temperature Two grams of activated charcoal were then added to the solution, which was shaken for 2 minutes and filtered. The filtrate was kept in the dark at 0 to 4 C. I was allowed to reach room temperature before being used. *Procedure* Air dried smears were fixed in absolute methanol for 10 minutes and rinsed in distilled water They were then treated) in the periodic acid solution for 8 to 10 min and rinsed in distilled water b) in reducing bath for 1 min, rinse in distilled water) in Schiff' reagent for 30 min and rinsed in distilled water d) in running tap water for several minutes) for counterstaining in Harris Haematoxylin for 10 min, rinse in tap water The success of the stain was judged from the intensity of staining in the white blood cells. As rule at least 500 erythroblasts from bone marrow or blood were inspected for PAS-positivity the results have been expressed as percent of PAS positive erythroblasts. I only exceptional cases fewer cells were counted, because of the low proportion of normoblasts in the periphery *Diastase digestion.* Smears fixed in absolute methanol, as above were treated in 0.1 solution of diastase (Merck malt diastase or pure diastase) in normal saline, for one hour at room temperature Human saliva, as source of diastase was also tested. Control slides, fixed in methanol, were treated with normal saline and incubated for one hour

Methylgreen-Pyronin stain. The staining solutions were prepared as recommended by Kurnick (9b) A 2% aqueous solution of Pyronin G (BDH) and 2 aqueous solution of Methyl-Green (HARLECO) are extracted separately with $CHCl_3$, until the $CHCl_3$ layer becomes colourless. The working solution is made by mixing 12.5 ml of the purified solution of Pyronin G and 7.5 ml of the solution of Methyl-Green with 15 ml of distilled water I some experiments Pappenheim-Saathof stain (HARLECO) was used. *Procedure* 1 Brief fixation of slides by Carnoy fluid 2 immersion in the Methyl-green-Pyronin solution for 10 min 3. rinse in running tap water *Ribonuclease digestion.* Smears, fixed briefly in Carnoy fluid, are incubated in solution of crystalline ribonuclease BDH' (0.5 mg/ml in glass distilled water for one hour at 37° C. After washing in running water the slides are stained by the Methylgreen-Pyronin method.

Alcian Blue (10) The smears are fixed in neutral formalin or in Carnoy fluid and stained in freshly filtered solution of Alcian Blue 8 G S, 0.15 gm in 3 acetic acid.



Fig. 1

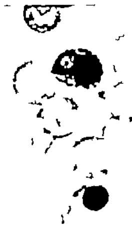


Fig. 2

Fig. 1. Case No. 5, table I blood A strongly PAS-positive polychromatophilic normoblast and two PAS-negative cells with pyknotic nuclei. PAS stain with haematoxylin counterstain.

Fig. 2. Case No. 6, table I blood A strongly PAS-positive cell in the center with dense PAS-positive granules surrounding the haemoglobinaemic inclusion body and the nucleus. Another normoblast with inclusion (left) and one without inclusion are PAS-negative.

for about 20 min. After rinsing in distilled water the slides are briefly rinsed in 1% acetic acid and then rinsed again in distilled water Neutral red or Safranin 0 is then used for nuclear counterstain. Touch preparations from freshly obtained piece of umbilical cord were used as positive controls.

Prussian Blue stain. The smears were stained for haemosiderin by the method of RATH AND FINCH (11)

Benzidine stain. This stain was applied according to LEPEHNE (12)

Methyl Violet stain. This was applied as vital stain for the demonstration of haemoglobinaemic inclusion bodies on venous blood or bone marrow aspirates, collected in ACD from cases of COOLEY' anaemia, as described previously (4)

Results

Morphology

The morphological features of the PAS-positivity in thalassaemic normoblasts are shown in the accompanying figures 1–6 We would like to emphasize the intensity of staining often stronger than the PAS-positive substance of granulocytes, and the preponderantly coarse granular appearance There is some variation in the arrangement of these granules, which may cover densely the entire cytoplasm or may be placed only at the periphery and in

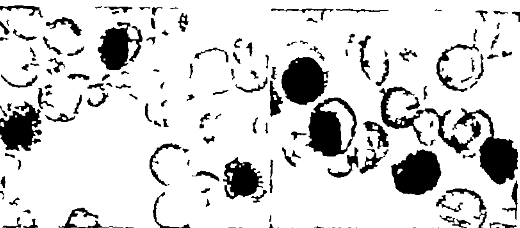


Fig 3 Fig 4

Fig 3 Case No. 8, table II blood A strongly PAS-positive normoblast at left, faintly positiv one at right and negativ one in the upper center
Fig 4 Case No. 9 table II, blood Faint, diffuse PAS-positive material surrounding the large inclusion body and in the cytoplasmic rim in the normoblast t left. The cell in the center is moderately positive while the one at right is PAS-negative.

zones bridging the nucleus with the periphery Diffuse staining was encountered only rarely exclusively in late normoblasts (fig 4) PAS-positive red cells were also a rarity even in cases with high percentages of positive normoblasts.

By successive staining for iron and polysaccharides it became evident that both cytochemical abnormalities may be present in one cell however the number of iron granules was smaller and their arrangement was clearly different. PAS positive cells may or may not contain iron granules and vice versa the existence of a more subtle relationship between the occurence of these two abnormalities is not necessarily excluded by these qualitative findings.

As concerns the haemoglobinisation of the PAS positive cells, studied after previous staining with benzidine, it was evident that most positive normoblasts had a very low haemoglobin content even when mature The PAS-positive granules often appeared to be arranged in the same areas with haemoglobin, as on the rim of cytoplasm in folds of the cellular membrane and in bridges connecting the nucleus to the periphery In cases of normoblasts which had also an inclusion body the PAS-positive granules were arranged around the inclusion fig 2) which could be thus recognized easily when sufficiently large PAS-positivity does not necessarily accompany the presence of an haemoglobinaemic inclusion several cases



Fig 5 *Fig 6*

Fig 5. Case No. 10, table II, blood. PAS-positive granules in the haemoglobinized areas of the cell at left, while the normoblast at right is negative.
Fig 6. Numerous PAS-positive normoblasts and a non-nucleated cell (erythroblastic fragment) in the blood of the case of Hb Pylos β-thalassemia (table III, b, case 2)

with a very high percentage of inclusion-carrying cells had few PAS-positive ones, but the two abnormalities are by no means mutually exclusive. The inability to visualize smaller or less dense inclusions, because the methyl violet stain disappears during the PAS staining procedure, precludes a precise quantitative evaluation of the interrelation of the two abnormalities.

The PAS-positive cells are mainly polychromatophilic and orthochromatic normoblasts, but, judging from the appearance of the nucleus, the analogy of PAS-positive cells at the polychromatophilic stage appears to be higher, at least in the bone marrow. Basophilic erythroblasts very rarely display PAS-positivity; the phenomenon appears also rather rarely in very pyknotic, over-mature normoblasts. The exact distribution of PAS-positive cells according to age was hampered by the difficulty in defining the degree of cytoplasmic maturation on smears treated with the PAS-reagent and counterstained with a nuclear counterstain.

Qualitative Study

The smears from 6 cases with pronounced PAS-positivity were subjected to digestion with maltdiastase or purified diastase. The

results have been, on repeated testing uniform with both preparations and consisted in disappearance of the PAS positivity of the normoblasts and of the white cells. Control smears immersed for the same period of time and at the same temperature in saline displayed no change in PAS positivity so that the difference between control smears and diastase treated smears was indeed striking *In view of the specificity of the diastase digestion it is concluded* that the positive PAS reaction is due to the presence of glycogen

Treating of the smears with saliva did also cause constant reduction of PAS-positivity which, however was sometimes less complete than with the enzyme preparations. Smears prepared two *years prior to testing which had been unfixed and unstained* displayed resistance to the digestion of the PAS-positive material of both normoblasts and white cells.

By pyronin methyl green staining it became evident that there was no connection between pyroninophilia and PAS-positivity About 90 of the pyroninophilic normoblasts were judged to be either basophilic or polychromatophilic. The pyroninophilic material differed in appearance from the PAS positive granules it was more finely granular usually with delicate bridges connecting these granules. The haemoglobinaemic inclusion bodies were pyronin-negative Following digestion with ribonuclease performed with appropriate controls, the pyrininophilia disappeared whereas *PAS positivity could be still demonstrated, unaltered Thus*, we did not confirm the ribonuclease resistant pyroninophilia described by ASTALDI et al. (2) for the PAS positive granules.

By staining with Alcian blue, no positive staining could be seen in any normoblasts of highly PAS positive cases. This would exclude the presence of an acid mucopolysaccharide, for which this stain is specific (10)

Occurrence

β-Thalassaemia The detailed results are given on tables I and II It should be stated that the material is markedly heterogeneous as concerns age of patients, severity of condition, previous transfusions and frequency of transfusions, previous splenectomy and degree of anaemia. The genetic constitution is also variable unfortunately it could not be established in all cases, especially older patients On the tables only the degree of anaemia and the overall

Table I

Thalassaemia major PAS-positiv erythroblasts in bone marrow and blood.

Case No.	Sex	Age	Hb	Erythroblasts per 100 WBC	Hb F	Clinical Severity	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Erythroblasts PAS (+) % Bone marrow	Erythroblasts PAS (+) % Blood
1	M	1 year	9.1	14	44	Severe	—	+	12.8	3.0
2	M	14 months	5.6	96	33	Severe	—	+	30.8	4.0
3	F	16 months	6.0	24	8	Severe	—	+	7.0	4.0
4	M	3 years	9.0	Very rare	60	Severe	—	+	29.0	
5	M	3 years	7.4	100	26	Severe	—	+	22.3	23.0
6	M	3.5 years	4.8	532	48	Severe	+	—	19.0	7.6
7	M	4 years	5.0	7	98	Severe	—	—	13.8	
8	F	5 years	4.5	9	58	Severe	—	—	19.4	15.0
9	F	5 years	6.6	184	62	Severe	—	—	27.0	21.4
10	F	6 years	5.6	332	72	Severe	—	—	20.8	21.0
11	F	6 years	7.2	Very rare	40	Severe	—	+	23.0	
12	M	7 years	8.1	1	65	Intermed.	—	—	7.4	
13	M	8 years	6.4	Very rare	60	Severe	—	+	29.4	
14	F	22 years	6.6	Very rare	7.5	Intermed.	—	+	3.4	
15	F	26 years	7.6	5	98	Intermed.	—	—	0.2	
16	M	28 years	10.2	32	70	Intermed.	—	—	11.0	1.0
17	F	28 years	6.0	—	11	Intermed.	—	+	0.1	
18	M	31 years	2.2	1	53	Intermed.	—	—	7.2	
19	F	32 years	6.6	9	7.8	Intermed.	—	+	0.0	
20	F	35 years	4.3	1	47.9	Intermed.	—	—	8.0	
21	M	40 years	6.7	1	32	Intermed.	—	—	4.0	
22	M	60 years	6.8	6	6	Intermed.	—	—	0.17	

No figures given because of the very small number of circulating normoblasts.
Both parents with A_2 thalassaemia trait.
Either one or both parents not available for study I all instances examined the one parent or sibling had high A_2 thalassaemia trait.
Combination of high A_2 with high F type of thalassaemia traits.
Megaloblastic bone marrow at the time of study

severity of the condition, as judged from need for transfusions, extent of bone changes and impairement of growth, are indicated. Levels of Hb F are also given, though they are not very meaningful in patients recently transfused.

PAS-positive normoblasts were observed in all cases, but as can be seen on the tables, there is a great variation in the percentage of positive normoblasts. In several cases (table I, No 15 17 19 and 22) the positive cells in the bone marrow were so few as to be practically absent. Whenever specimens of bone marrow and blood were taken on the same date the percentage of PAS-positive cell was usually higher in the bone marrow In few cases the proportion were equal but in no case was the percentage much higher in the

Table II

Thalassemia major PAS-positive erythroblasts in blood.

Case No.	Sex	Age	Hb g	Erythroblasts per 100 WBC	Hb F %	Clinical severity	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Normoblasts PAS (+)
1	M	6 months	7.9	12	79.5	Severe	—	—	4 0
2[1]	M	4 months	6.7	30	85.0	Severe	—	—	29.6
3[1]	M	6 months	7.2	15	66 6	Severe	—	—	7.0
4[1]	M	2 years	5.5	14	98.0	—	—	—	4.0
5[1]	M	5 years	4.9	11	35.0	Severe	—	+	35.0
6[2]	M	4 years	7.3	38	98.0	Intermed.	—	—	6 4
7[1]	M	4 years	7.2	3	38 0	Severe	—	+	8.0
8[2]	F	4 years	7.6	40	75.0	Severe	—	—	8.4
9[2]	F	4 years	7.8	219	50.0	Severe	+	+	8.6
10[2]	F	5 years	9 4	36	58.0	Severe	—	—	8.0
11	M	5 years	2.9	42	85.0	Severe	—	—	3.4
12[1]	M	3 years	9 6	40	10.7	Severe	+	+	1.0
13	M	5 years	5.2	61	24.0	Severe	+	+	5 6
14[1]	F	3 years	8.4	360	30.0	Intermed.	+	+	0 4
15[1]	M	7 years	9 4	11	27.0	Severe	—	+	24.6
16[1]	F	8 years	7.0	40	19.0	Intermed.	—	+	2.4
17[2]	M	8 years	5.6	203		Severe	+	+	10.2
18[2]	F	9 years	7.0	802	43.0	Intermed.	+	+	1 2
19[1]	F	9 years	7.6	450	96.0	Intermed.	+	—	1.2
20[1]	F	9 years	4.8	398	73.0	Severe	—	—	42.0
21	F	9 years	7.9	16	33.0	Severe	—	+	5.0
22	F	10 years	4.8	196	52.5	Intermed.	+	—	2.0
23[1]	F	12 years	7.2	630		Intermed.	+	+	4.2
24	M	12 years	6.9	12	15.2	Intermed.	+	+	3.0
25[1]	M	13 years	5.8	146	54.0	Intermed.	+	+	1 4
26[1]	F	15 years	8.3	111	90.0	Severe	+	—	3.8
27[1]	F	15 years	8.2	695		Intermed.	+	+	1 0
28[1]	F	16 years	5.0	802	52.0	Severe	—	—	1.2
29[2]	F	20 years	7.2	264	11 7	Intermed.	+	—	1 0
30[2]	M	28 years	8 7	110	7.8	Intermed.	+	—	0.1
31	M	31 years	6.3	298	26.0	Intermed.	+	—	1.6

Both parents with high A_2 thalassemia trait.

Either one or both parents not available for study In all instances examined the one parent or sibling had high A_2 thalassemia trait.

blood than in the bone marrow When the proportion of PAS positive normoblasts in the periphery is low no accurate deductions can be drawn concerning the situation in the bone marrow

Splenectomy though causing always a striking increase of the number of circulating normoblasts, was not associated with a higher degree of PAS positivity if anything the percentages of PAS-positive cells in the periphery are lower in splenectomized patients.

These lower percentages may be connected with the constitution of the erythroblastic population following splenectomy after which the very mature pyknotic erythroblasts preponderate in the periphery

Correlation with the levels of Hb F is practically absent cases presenting exclusively or almost exclusively Hb F are among those with very low PAS positivity Low degrees of positivity were also encountered in non transfused patients with low percentages of Hb F The effects of transfusion on the degree of PAS positivity have not been evaluated.

A rough correlation can be seen between the degree of PAS positivity with the age of the patient or with the overall severity of the patient s condition. High degrees of PAS positivity are exceptional in cases beyond the first decade of life and were not seen in the cases characterized as intermediate Intensively stained PAS positive normoblasts were observed in infants with thalassaemia major aged 6 months or less (cases 1 2 and 3 table II) and the abnormality could be detected, fully expressed, at birth, in infants in which the diagnosis was made at that time and corroborated again later (to be published)

Double heterozygotes for β-thalassaemia and haemoglobin variants The results are shown on table III The degree of PAS positivity in the blood and bone marrow of microdrepanocytic patients is low with only one notable exception (case 2 table III) In β-thalassaemia/Hb Pylos double heterozygotes one patient displayed one of the highest degrees of positivity of the whole series (fig 6) while in his brother the findings were unimpressive the latter was in a better general condition. The findings in Hb E/β-thalassaemia were not impressive.

Thalassaemia trait. The bone marrow of 10 adults was examined, with entirely negative findings. However in some newborns later shown to have the trait, up to 12% positive normoblasts were seen the intensity of staining was clearly and constantly weaker than observed in thalassaemia major

Other haemoglobinopathies. The findings were negative in one case of homozygous Hb S disease; only 2 weakly stained positive cells among 600 were seen in the case of haemoglobinopathy H on which bone marrow was obtained.

Other anaemias: Weakly to moderately positive findings were obtained in the bone marrow in 6 out of 9 patients with iron deficiency anaemia. The degree of positivity

Table III

Case No.	Age	Sex	Hb g %	Hb F %	Erythroblasts per 100 WBC	Splenectomy	Transfusions in the last three months	Normoblasts PAS (+) %	
								Bone marrow	Blood
) Haemoglobin S/β-thalassaemia									
1	5	F	7.6	7.8	0	—	+	1.3	
2	7	F	10.0	5.0	0	—	+	24.6	
3	8	M	3.7	2.0	120	—	—	6.8	7.0
4	10	F	6.0	10.0	0	—	—	0.0	
5	24	M	9.1	17.5	116	—	—		2.5
6	26	F	11.0	27 7	1	—	—	0.2	
7	27	F	5.9	22.0	182	—	+		0.85
8	32	F	7.2	10.2	58	+	+		0 0
b) Haemoglobin Pylos/β-thalassaemia									
1	3	M	8.8	36.0	32	—	—		2.0
2	6	M	5.8	70.0	600	+	—		46.0
c) Homozygous drepanocytic anaemia									
1	13	F	9.6	5.8	very rare	—	—	0.0	
d) Haemoglobin E/β-thalassaemia									
1	15	F	7.9	25.0	190	+	+		0.4
) Haemoglobin H disease									
1	40	F	7.9	2.0	0	—	—	0.32	
f) Hypochromic anaemia (Serum iron 9 to 27 γ%)									
1	16 mths	M	5.2	<2.0		—	—	14.0	
2	13	F	4.7	<2.0	very rare	—	—	16.0	
3	70	M	6.4	<2.0	0	—	—	1.8	
4	69	M	7.9	<2.0	0	—	—	0.0	
5	17	F	6.0	<2.0	0	—	—	5.0	
6	10	M	7 1	<2.0	0	—	—	3.0	
7	62	M	6.5	<2.0	0	—	—	3.2	
8	69	F	6.8	<2.0	0	—	—	0.0	
9	65	F	7.0	<2.0	0	—	—	0.0	

appeared to correlate somewhat with the degree of anaemia and serum iron levels (table III) PAS positive erythroblasts (22%) and erythrocytes (6%) were also found in one infant with acute erythroleukaemia and in one anaemic newborn with congenital syphilis (3% PAS positive erythroblasts). PAS positive erythroblasts were seen in one case of subacute myeloid leukaemia (16%) and in the acute phase of case of chronic myeloid leukaemia (2,8%) In two other cases of chronic myeloid leukaemia the findings were negative. In one case of myeloid metaplasia following polycythaemia the PAS positive erythroblasts were 5.6%

Newborns. Five normal newborns were tested; in one case 2% of the bone marrow normoblasts were PAS positive, 0.2% were positive in another while no positive cells were found in the remaining 3 cases.

Discussion

The work of ASTALDI et al. describing for the first time the presence of PAS positive material in normoblasts of a large group of patients with thalassaemia (2, 3) has been corroborated by similar studies carried out on smaller groups (13, 14, 15, 16), isolated cases (17) or unspecified numbers of individuals with this disease (18, 19). ASTALDI's work also opened the way to the application of the PAS reaction to other disturbances of erythropoiesis. PAS positive erythroblasts have now been described to occur regularly in sideroblastic and sideroachrestic anaemias (20, 21, 22), erythroleukaemias and DI GUGLIELMO's syndrome (14, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24) and in iron deficiency anaemia (17, 21, 25). In addition PAS positivity was found in erythroblasts in few or isolated cases of the following diseases: pernicious anaemia (21, 22), aplastic anaemia (21), leukemias (3, 17), lead poisoning (26), benzol poisoning (27), polycythaemia (21) and pyridoxine responsive anaemia (28). In all these conditions, whenever the PAS positive substance has been subjected to further investigation it proved to be glycogen (17, 21, 23, 25, 26, 33). Only FERRARA (27) observed, that the PAS positive material of erythroblasts in benzol poisoning was not digestible by saliva. However, apart from the initial study of ASTALDI et al. (3), all subsequent reports dealing with thalassaemia have not been concerned with the elucidation of the nature of the PAS positive substance. Thus the initial interpretation, that the abnormal substance in thalassaemia is a gluco- or mucoprotein or a neutral mucopolysaccharide, has been generally accepted. It was based chiefly on the inability to obtain digestion of the PAS positive substance by saliva or diastase and also on positive protein reactions (3). SEN GUPTA et al. (29) suggested that the PAS positive material may be an acidic mucopolysaccharide, probably similar to the PAS positive substance observed by them in the 'foam' cells of thalassaemia*.

---

* According to observations from this laboratory the 'foam' cells of the bone marrow in one case of thalassaemia major contain indeed a diastase resistant PAS positive substance, diffusely distributed over the cytoplasm; the same cells however are also strongly and diffusely positive with iron stain. These two staining properties of the 'foam' cell are entirely different from those of the PAS positive substance of normoblasts. After further cytochemical investigation, we concluded, that this PAS positive substance is a gluco- or mucoprotein. These properties suggest that 'foam' cells may contain ferritin and apoferritin, proteins which are known to have a high carbohydrate content (30, 31).

The results of the present cytochemical study leave no doubt in our minds that the PAS positive material of thalassaemic normoblasts is indeed glycogen. After completion of the present study we became aware of three other reports (25 32, 33) indicating that the PAS positive material in thalassaemic erythroblasts is glycogen. These opinions have remained largely unknown*

Before trying to interpret the phenomenon of glycogen accumulation in thalassaemia, it is useful to recapitulate the main features of the abnormality in this condition, as they arise from this and other reports.

1 PAS positivity is demonstrable mainly in polychromatophilic and to a smaller extent in very mature, pyknotic normoblasts, in agreement with the observations of Astaldi et al. (3) Occurrence in red cells is a rarity It follows that the percentage of PAS positive cells depends, among other factors, on the constitution of the erythroblastic population of either blood or bone marrow of a given patient and at a given time.

2. PAS positivity is more frequent in cells which are practically devoid of haemoglobin it also occurs in cells carrying an haemoglobinaemic inclusion body However severe hypochromia and inclusion bodies being a very frequent characteristic of thalassaemic normoblasts, more quantitative data are needed for establishing any correlation.

3. Higher degrees of PAS positivity were generally observed in severe cases of thalassaemia, while in cases of intermediate severity and in most β-thalassaemia/abnormal haemoglobin combinations, much lower degrees and even negative findings were obtained. This is in agreement with the findings of Quattrin and Dini (16) and of Chiamarosa (15) who report low degrees of positivity or negative results, respectively in thalassaemia intermedia. The proportions of PAS positive cells given by Astaldi et al. (3) for thalassaemia major are generally higher than ours their material consisted only of children aged 6 months to 6 years, but no information concerning the severity of their condition is given. A notable exception to this general pattern is found in the two unusual cases of Mattioli and del Piano (32) who had over 50% positive cells in spite of a mild condition. In the present series, occasional severe cases presented low PAS positivity in the bone marrow but no intermediate case with high positivity has been observed so far by us. As concerns thalassaemia trait, there is universal agreement that the finding are negative (3, 15, 16)

4. PAS positivity appears to be more intense in younger patients. Since survival depends on the severity of the condition and milder cases have lower degrees of PAS-positivity any relationship between age and intensity of the phenomenon will have to be decided by follow up studies. In any event, the lack of intensification of the phenomenon proves that it is not secondary to some general effect of the disease, like for instance iron accumulation or intense erythropoietic stimulation. An even better proof for this is offered by the fact that PAS positivity can be demonstrated at birth, at which time none of the classical features of the condition are manifest PAS positivity shares this characteristic of early presence with the phenomenon of haemoglobinaemic inclusions (34).

---

* We have not found reference to these works in relevant textbooks, monographs or specialized papers at the recent Symposium on Cytochemistry in Haematology the prevailing opinion that the PAS positive substance in thalassaemia normoblasts is different from the PAS positive granules in other disturbances of erythropoiesis was not disputed (26). Recently Astaldi et al. have again defended their initial opinion that this substance is not glycogen 28

5. There is no direct association of PAS positivity with the level of foetal haemoglobin, fact noted already by others (3). However PAS positive normoblasts may occur normally in low percentages in healthy newborns or young infants (17 35) and our findings corroborate this. A greater propensity for glycogen formation in the cells of infants results also from the observation of PAS positive cells in thalassaemia trait at this age, while in adults with the trait the findings are negative. This tendency for glycogen formation is not necessarily linked to Hb F synthesis, but may be due to differences in the milieu or to enzymatic differences in the erythropoietic cells between early and later periods of life. Several enzymatic and metabolic differences between the red cells of cord blood and of adults have been already demonstrated (36). It should be made clear however that the presence of neither Hb F nor glycogen allows, in itself, the conclusion that the cells in thalassaemia are embryonic.

Glycogen is a major component serving as an energy source in the animal kingdom Normally erythroblasts do not contain glycogen at least not in amounts histochemically demonstrable (37) all energy being used up, or stored otherwise. Its demonstration in normoblasts under certain circumstances proves that in these cells the enzymatic pathways for glycogen synthesis are present and potentially operative (38) (fig 7) Phosphoglucomutase (PGM) and uridinediphosphoglucose-pyrophosphorylase (UDPG-P) have been identified in red cells (38) The presence of enzymes intervening in the metabolism beyond these stages, phosphorylase and UPD-glycogen-transglucosylase, is rendered necessary once glycogen formation and presumably breakdown occur in normoblasts and since glycogen accumulation has been reported in the red cells in glycogen storage disease of the phosphorylase deficient variety (37 39) PGM is responsible for the glucose 1 phosphate (G-1 P) $\rightleftarrows$ glucose-6-phosphate (G-6-P) reaction, the former metabolite being the necessary precursor for the synthesis of glycogen, very likely over the uridine-glucose pathway The PGM reaction is at equilibrium at a G-6-P to G-1-P ratio of 19 to 1 (40) Thus appreciable amounts of G-1-P may be formed when increased quantities of G-6-P are fed into the system and G-1 P is removed, for instance through glycogen formation. G-6-P is also known to enhance greatly the activity of UDPG-glycogen transglucosylase (40) It is tempting to assume that increased availability of G-6-P may be a major factor in shifting the reaction toward glycogen synthesis.

Glycogen accumulation in thalassaemic normoblasts, though early frequent and extensive enough as to indicate a close association to the primary disturbance of this disease, is not universally present in all cells and in all cases thus, it cannot constitute, in itself, the primary abnormality Its presence, however suggests that

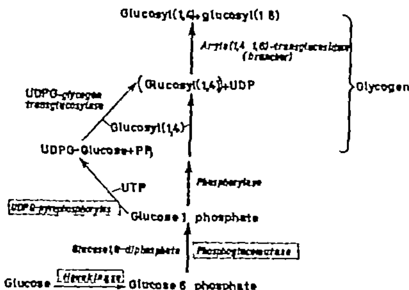


Fig 7 Pathway for glycogen synthesis. Enzymes identified in human red blood cells are placed between broken lines.

an important surplus of energy occurs in thalassaemic normoblasts. A plausible explanation for the causation of this surplus is the great reduction or complete absence of β-chain synthesis. Normally during maturation of the normoblasts, from the early polychromatophilic stage onwards, the protein concentration per unit area of cell increases rapidly to more than double of the previous values (41 42) because of intensive haemoglobin synthesis (43) Protein synthesis being an energy requiring process, any interference with globin synthesis may be responsible for the energy to be present in excess of the needs this surplus may then be channeled into the normally latent pathway of glycogen synthesis.

The proposed hypothesis that glycogen storage in thalassaemic erythroblasts is the result of very severe impairement of haemoglobin synthesis will have to be substantiated by more detailed studies. However it is supported by the occurence of glycogen in severe iron deficiency anaemia, in hypochromic non-sideropenic anaemia and in anaemia of lead poisoning Recently LARIZZA mentioned the presence of PAS positive granules (glycogen?) in the cytoplasm of the 'porphyroblasts in erythropoietic porphyria (44) Erythraemia, erythroleukaemia and several other conditions, however are not considered as presenting severe hypochromia. In

these cases the glycogen storage may be due to different causes the exact situation will be defined only by more detailed studies of the affected erythroblasts in each of these conditions, as well as of the extracellular factors which may influence glycogen deposition.

GRIGNANI et al. (45) have reported that the overall energy metabolism and the energy rich phosphate compounds in thalassaemic cells do not differ appreciably from normal. The results of these studies, carried out on a limited number of cases, cannot be extended to the earlier stages of the erythron. Energy production in circulating red cells is very low being restricted to the Embden-Meyerhof pathway while normoblasts contain mitochondria and the cytochrome system through which the complete citric acid cycle, the main source of ATP can operate. Furthermore, in the majority of circulating cells of thalassaemia major the reduction or cessation of β-chain synthesis has been compensated to a large extent through γ-chain synthesis (46) This compensation is expected to restrict the indirect effects of the abnormal genes, among others the surplus of energy and the need for its storage. Thus, the surplus of energy will occur only in those cells in which the entire energy producing apparatus may operate, while the use of the energy is impaired rather severely This phenomenon of energy unbalance is expected to manifest itself only in some cells during a limited period of their life It presupposes a certain degree of failure in the finer adjustement of energy production to the functional needs of the thalassaemic normoblast during haemoglobinisation.

It is also worth noting that thalassaemic red cells have a generally higher than normal enzymatic complement (45 47 48, 49) including hexokinase (45) These enzymatic increases, studied so far for the majority of enzymes in only few cases, may be due in part to the younger mean age and in part to the reduction of the volume of thalassaemic erythrocytes. Information on all these aspects is certainly still fragmentary and much more extensive studies are needed such studies will clarify whether this pattern of increased enzymatic activity is or is not in part a further effect of deficient globin synthesis, because of which the protein synthesizing machinery – building blocks, ribosomes and energy – remains longer available for the construction of other proteins. Be this as it may the usual ways of expressing enzymatic activities may not reflect sufficiently the actual conditions prevailing in the thalassaemic

cells, although these are smaller than normal, even in the basophilic stage [illegible]. Taking into consideration the [illegible] increase of [illegible] per cell and the reduction of cell size, we can visualize that the concentration of enzymes per unit of space may reach values much higher than normal. Reduction of cytoplasmic size may cause further crowding upon the normal [illegible] of the [illegible] metabolic components of the immature red cell. The repercussions of all these changes on the regulation of metabolism and general [illegible] of the thalassemic normoblast can be expected to be [illegible].

As concerns the fate of the erythroblastic glycogen, which is practically not demonstrable in red cells, the following possibilities exist: 1. Reversal of the process following reduction of energy production concomitant with maturation. 2. Enzymatic degradation, concomitant with maturation and the breaking up of the internal structure of the cells. 3. Selective premature death of some PAS positive cells at the erythroblastic stage, in situ or and very soon after their entry into circulation. An analogous phenomenon has been proposed for the [illegible] cells [illegible]. All three mechanisms may be involved, since none excludes any of the others. The contribution of each will have to be determined by further studies.

Acknowledgement: We thank Prof. [illegible] and Drs. [illegible] and [illegible] for permitting the study of some of the cases. We are also indebted to Dr. [illegible] and Dr. [illegible] for some cases and to Dr. A. [illegible] for the care of [illegible] thalassemia.

Summary

The presence of the Periodic Acid Schiff positive material in the normoblasts of homozygous β-thalassemia and related conditions has been [illegible]. The staining properties and removal of the material by diastase indicate that the PAS positive material is glycogen. Glycogen, iron granules and Heinz body-like inclusion bodies may coexist in one cell. There is a [illegible] positive correlation between severity of the disease and degree of PAS positivity. Adult cases of β-thalassemia that have PAS negative [illegible]. The findings are discussed in the light of present concepts on the pathogenesis of β-thalassemia. It is suggested that accumulation of glycogen is [illegible] means of storing the energy which may occur in excess because of the severe reduction in hemoglobin synthesis.

Résumé

La question des substances PAS-positives dans les normoblastes de la β-thalassémie homozygote et d'états apparentés a été [illegible]. Les propriétés de coloration, et [illegible] la disparition par la diastase de ces substances, indiquent qu'il s'agit de glycogène. Glycogène, granulations de fer et inclusions rappelant celles de Heinz se trouvent [illegible]

parfois dans la même cellule. Il existe une corrélation approximative entre la gravité de la maladie et l'intensité de la réaction au PAS. Ces constatations sont discutées à la lumière des conceptions actuelles sur la pathogénèse de la β-thalassémie. L accumulation de glycogène serait un moyen d entreposer l'énergie qui se trouverait en excédent à la suite de la forte réduction de la synthèse de l'hémoglobine.

Zusammenfassung

Die Natur des PAS-positiven Materials in Normoblasten von homozygoter β-Thalassämie und verwandten Zuständen wurde einer erneuten Prüfung unterzogen. Aus den färberischen Eigenschaften und vor allem aus dem Abbau durch Diastase geht hervor daß es sich dabei um Glykogen handelt. Glykogen, Eisengranula und Einschlüsse nach Art der Heinzschen Körperchen kommen gleichzeitig in derselben Zelle vor kommen. Es besteht eine gewisse Beziehung zwischen der Schwere der Krankheit und dem Grad der PAS-Reaktion. Erwachsene mit β-Thalassämie-Veranlagung haben PAS-negative Normoblasten. Die Befunde werden besprochen im Hinblick auf die derzeitige Auffassung von der Pathogenese der β-Thalassämie. Es wird vermutet, daß die Ansammlung von Glykogen eine Art von Energiereserve darstellt, die zufolge der schweren Verminderung der Hämoglobinsynthese im Überschuß auftritt.

References

1 Pergola, L. Dibenedetto Dell Aquila, M I siderociti nel morbo di Cooley sindromi affini. Boll. Soc. ital. Biol. sper 25. 1460 (1949)
2. Astaldi, G. Rondanelli, E. G Strosselli, E. Positività della reazione di Hotchkiss su una percentuale degli eritroblasti della talassemia major (morbo di Cooley) Boll. Soc. ital. Biol. sper 28 1081 (1952)
3. Astaldi, G.; Rondanelli, E. G.; Bernadelli, E. and Strosselli, E. An abnormal substance present in the erythroblasts of Thalassaemia major Cytochemical investigations. Acta haemat. *12*: 145 (1954).
4 Fessas, Ph. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. Blood *21* 21 (1963)
Fessas, Ph.; Loukopoulos, D and Thorell, B. Absorption spectra of inclusion bodies in β-thalassemia. Blood 25. 105 (1965)
5. Baglioni, C. Correlations between Genetics and Chemistry of Human Haemoglobins; in Taylor's Molecular Genetics, part. I p. 405 (Academic Press, New York 1963).
6. Dacie, J V The Haemolytic Anaemias, part I, p. 53, 2nd ed. (Churchill, London 1960).
7 Fessas, Ph. and Loukopoulos, D Alpha-chain of human hemoglobin Occurrence in vivo. Science *143.* 590 (1964).
8. Dance, N. Huehns, E. R. and Beaven, G. H. The abnormal haemoglobins in haemoglobin H-disease. Biochem. J *87* 240 (1963).
9. Pearse, A. G. E. Histochemistry (9a, p. 832, 9b, p. 826), 2nd ed. (Churchill, London, 1961).
10. Barka, T and Anderson, P Histochemistry p. 77 (Harper and Row New York 1963)
11 Rath, C. E. and Finch, C. A. Sternal marrow hemosiderin. A method for deter mination of available iron stores in man. J Lab. clin. Med. 33. 81 (1948).
12. Haematologische Tafeln «Sandoz» (Sandoz, Basel 1952).
13. Gouttas, H. B. W and Metz, J. The periodic acid-Schiff reaction as diagnostic aid in thalassaemia. Sth. afr J med. Sci. *22.* 7 (1957)

14 Baldini, M. Fudenberg, H. H. Fukutake, K. and Dameshek, W : The anemia of the Di Guglielmo syndrome. Blood *14* 534 (1959)

15. Chiamarossa, L.: Sull'anomalo reperto citochemico eritroblastico nella Talassemia. Atti delle Giornate di studio su ell problema sociale della microcitemia del morbo di Cooleys, vol. II p. 144 (Ist. Italiano di Medicina Sociale, Roma 1961)

16. Quattrin, N und Dini, E. Hämatologische, genetische und klinische Betrachtungen über einige Formen erblicher Hämoglobinopathien (300 Fälle). Schweiz. med. Wschr *92:* 1318 (1962)

17 Quaglino, P and Hayhoe, F G J Periodic acid-Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Guglielmo disease. Brit. J Haemat. 6. 26 (1960).

18. Chatterjea, J B.; Chowdhury A. B.; Ray N R.; Das Gupta, R. C. and Ray N H.: Cytochemical aberration in the normoblasts of Cooley anaemia. Bull. Calc. School trop Med. *4* 56 (1956)

19 Bessis, M.; Alagille, D. et Breton-Gorius, J Particularités des érythroblastes et des érythrocytes dans la maladie de Cooley Etude au microscope électronique. Rev Hémat. *13:* 538 (1958)

20. Hayhoe, F G J and Quaglino, D.: Refractory sideroblastic anaemia and erythraemic myelosis Possible relationship and cytochemical observations. Brit. J. *Haemat. 6.* 381 (1960).

21 Merker, H Cytochemische Beobachtungen bei Erythropathien unter besonderer Berücksichtigung von Glykogen und freien Eisen. Schweiz. med. Wschr *40:* 1209 (1961)

22. Verloop M. C. Zur Differentialdiagnose der essentiellen sideroachrestischen Anämien unter Berücksichtigung zytobiochemischer Befunde; in *Zyto- und Histochemie in der Hämatologie.* 9. Freiburger Symp. p. 553 (Springer Verlag, Berlin 1963).

23. Kawakita, Y and Horie, K. Periodic acid-Schiff reaction of erythroblasts in erythremic myelosis with special reference to the PAS positive substance. Congr int. Soc. Hemat., Mexico, p. 230 (Grune and Stratton, New York 1962)

24 Fleischhacker, H. und Kabin, P Die praktische Bedeutung zytochemischer Untersuchungsmethoden in der Hämatologie. Med. Welt *35.* 1783 (1963).

25. Sansone, G. Bertolotti, E. Ricerche citochimiche sugli eritroblasti di prematuri anemici. Atti VII Congr Soc. int. Emat., vol. II (Pensiero Scientifico, Roma 1958)

26. Heckner, F Polysaccharide in Blut und Knochenmarkszellen in Zyto- und Histochemie in der Hämatologie, 9. Freiburger Symp., p. 408 (Springer Berlin 1963).

27 Ferrara, A. Aspetti citochimici delle cellule ematiche di una emopatia benzolica. Boll. Soc. ital. Emat. *2:* 384 (1954).

28. Astaldi, G.; Strosselli, E. e Sauli, S. APS-positivita degli eritroplasti in diverse condizioni patologiche. Minerva Med. *55.* 1569 Suppl. 39 (1964).
Astaldi, G Strosselli, E. and Sauli, S. Histochemical research on erythroblasts PAS-positivity under various pathological conditions. Proc. 9th Congr europ. Soc. Haemat., Lisbon 1963 part II/1 p. 86 (S. Karger Basel 1963)

29. Sen Gupta, P C.; Chatterjea, J B.; Mukherjee, M. A. and Chatterjee, A. Observations on the foam cell in thalassaemia. Blood *16.* 1039 (1960)

30. Gedigk, R. and Strauss, G Zur Histochemie des Hämosiderins. Virchows Arch. *324* 373 (1953).

31 Wöhler, F Ferritin und Hämosiderin in Zyto- und Histochemie in der Hämatologie, p. 517 9 Freiburger Symp. (Springer Berlin 1963)

32. Mattioli, G. e Del Piano, E. Su due casi di talassemia minima monocorpresavità genica. Haematologica *46.* 83 (1961)

33. Sirnaggio, G. A. Pollitzer, C. Ricerche citochimiche sui polisaccaridi lipidi delle cellule ematiche midollari di bambini affetti da Talassemia major (morbo di Cooley) Arch. ital. Pediat. Puericult. 16. 247 (1963)
34 Fessas, Ph. Forms of thalassaemia; in Jonxis Abnormal Haemoglobins in Africa, p. 71 (Blackwell, Oxford 1965)
35. Efrati, P; Rozenszajn, L. and Shapira, E. The morphology of buffy coat from cord blood of normal human newborns. Blood 17 497 (1961).
36. Gross, R. T; Schroeder, E. R. and Brounstein, S. A. Energy metabolism in the erythrocytes of premature infants compared to full term newborn infants and adults. Blood 21 755 (1963)
37 Prankerd, T A. J The Red Cell, p. 61 (Blackwell, Oxford 1961)
38. Altman, J K. Some enzymologic aspects of the human erythrocyte. Amer J Med. 27 963 (1959)
39. Sidbury J B.; Cornblath, M. Jr. Fisher, J and Houre, E.: Glycogen in erythrocytes of patients with Glycogen storage disease. Pediatrics 27 103 (1961).
40. Field, R. A.: Glycogen Deposition Diseases in Stanbury's, Wyngaarden' and Fredrickson's The Metabolic Basis of Inherited Disease, p. 167 (McGraw-Hill, New York 1960)
41 Grasso, J A.; Woodard, J W and Swift H.: Cytochemical studies of nucleic acids and proteins in erythrocytic development. Proc. Nat. Acad. Sci. 50: 134 (1963).
42. Thorell, B.: Cytochemistry of red cell maturation; in III. int. Erythrozyten-Symp., Berlin 1960, p. 7 (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1960)
43. Thorell, B. Studies on the formation of cellular substances during blood cell production. Acta med. scand. 129: Suppl. 200 (1947)
44. Landizza, P The problem of erythropoietic porphyria in the light of the latest advances in biochemistry and morphology Panm. Med. 4 315 (1962).
45. Gerosa, F; Loeb, W G.; Brunetti, P et Waller, P H. Le métabolisme énergétique de l'érythrocyte thalassémique. Acta haemat. 28. 293 (1962)
46. Loukopoulos, D. and Fessas, Ph. The distribution of haemoglobin types in thalassemic erythrocytes. J clin. Invest. 44 231 (1965).
47 Teofilano, L. Belfiore, F Alcune attivita enzimatiche negli eritrociti di ammalati e portatori di Talassemia di talassodrepanocitosi. Haemat. lat. 5: 283 (1962).
48. Belfiore, F L'attivita latticodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassodrepanocitosi. Boll. Soc. ital. Biol. sper 38. 514 (1962).
49 Belfiore, F Calgara, G. Attivita malicodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassodrepanocitosi. Boll. Soc. ital. Biol. sper 40: 493 (1963).
50. Astaldi, G.; Tolentino, P Sacchetti, C. La Talassemia, p. 69–73 (Tipografia del Libro, Pavia 1951).

Authors' address: Drs. Ph. Fessas and Th. Papayannopoulou, Haematology Section and Laboratory Dept. of Clinical Therapeutics, Alexandra Hospital, *Athens 611* (Greece).

Acta haemat. 34: 20-29 (1965)

Department of Pediatrics, Central Emek Hospital, Afula; Section of Cell Biology The Weizmann Institute of Science, Rehovoth Laboratory of Hematology Meir Hospital, Kfar Sava Laboratory for Blood Morphology and Cytology Kaplan Hospital, Rehovoth

Cytochemical and Genetic Studies in Four Cases of Chediak Higashi Steinbrinck Syndrome

By N Sadan D Yaffe, L. Rozenszajn, H. Adar, B. Soroker and P Efrati

Although the rare Chediak Higashi-Steinbrinck (C.H.S) Syndrome has been repeatedly described in recent years, few reports of cytochemical observations have been published, nor has the hereditary factor in this syndrome been fully determined. The present paper describes four cases of this disease which occurred in two inter related families, with emphasis on the cytochemical and genetic aspects. Clinical examinations of three of the cases are reviewed briefly a more detailed clinical report will be published elsewhere.

Methods

Bone marrow and peripheral blood smears were examined as follows May-Grünwald-Giemsa staining; peroxidase reaction (1); peroxidase reaction for eosinophils (2); peroxidase reaction of Lepehne for haemoglobin (2); alkaline phosphatase activity (3); acid phosphatase activity (4); staining by PAS method of Hotchkiss (5) Sudan black B staining (6); Feulgen nuclear reaction (5) methyl-green pyronin staining, adaptation of Kurnick's method (7) toluidine blue staining (2) Prussian blue reaction (8)

Case Histories

Case 1 M. N., 22 months old female, was admitted to hospital suffering from enlarged spleen and liver raised temperature and extreme pallor

The parents, Iraqi Jews, were first cousins. Of 3 siblings who died abroad in childhood, two were described as albinoids. The parents and remaining 4 siblings were in good health. The patient had a history of repeated intestinal and respiratory infections. A hepatitis of 2 weeks duration which took place 1 month prior to admission was reported.

On admission, the spleen was palpable 4 cm below the costal arch and the liver was enlarged, although only slightly Temperature was 37° C. X-ray of the chest re-

Table I
Clinical data.

	Case 1 ♀	Case 3 ♂	Case 4 ♂
♂ Albinism		+	+
Fair hair	+	+	+
Spontaneous nystagmus	?	?	+
Lymphadenopathy	+	+	
Hepatomegaly	+	+	
Splenomegaly	++	+	+
Infiltration of lung	+	+	
Pleural effusion		+	
Purulent secretion from ear		+	
Fever	+	+	

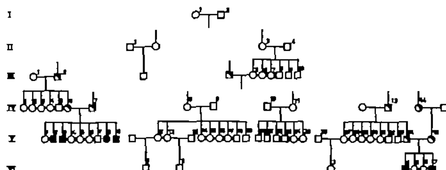


Fig. 1 Pedigree of two inter-related families with CHEDIAK-HIGASHI-STEINBRINCK syndrome. ● ■ = Involved subjects (homozygotes); = Presumptive heterozygotes V8, V9 V14, V17 = cases 1 2, 3, 4, respectively; V2, V3 = cases reported by the parents, of children who had died abroad with typical symptoms of the syndrome.

vealed circumscribed density in the right lung Typical signs of C.H.S. syndrome were found in haematological tests (table II)

A biopsy of the cervical lymph node (performed by Dr E. LEVY) showed that the normal follicles were replaced by diffuse increase of medullary tissue. Prominent sinuses with proliferation of lining cells were present. The medullary tissue consisted of lymphoid and reticulum cells, histiocytes and endothelial cells. Special staining revealed increased reticulum formation.

During the course of the disease, the cervical and axillary lymph nodes became enlarged. After temporary abatement of symptoms, the child left the hospital, but was readmitted with high temperature. The patient died at the age of 26 months.

Case 2: B. N the sibling of M. N 3 months old male, was hospitalized for investigation. The clinical examination showed albinoid appearance. Spleen and liver were normal (examined by Dr A. AVRON) Haematological investigation revealed typical findings of C.H.S. syndrome. No additional data on the case are available.

Case 3. L. N 25 days old male was admitted to hospital because of cough and breathing disturbance occurring on the day prior to admission. The patient was the first son of Iraqi Jews inter-related to the parents of cases 1 and 2 (fig 1) The parents were also first cousins and in good health.

Table II
Routine blood examination.

	Case 1 ♀		Case 3 ♂		Case 4 ♂
Date	4/53	7/53	2/60	3/60	2/64
Hb, g%	10.9	5.9	6.5	2.5	9.0
Erythrocytes per cu. mm. × 10⁶		2.5	2.17	1.5	
Reticulocytes, ‰	1 4		1		
Leucocytes per cu. mm. × 10³	11.5	5.2	6.6		6.0–9.0
Neutrophils, %	10	6	29		4
Lymphocytes, %	76	90	70		92
Monocytes, %	14	4	1		4
Thrombocytes per cu. mm. × 10³	380		67		

The child was albinoid in ppearance. Physical and X-ray examinations of the chest indicated the possibility of an effusion in the right pleural cavity The liver was palpable 4 cm below the right costal arch and the spleen 2 cm below the left one. The lymph nodes were not enlarged. Haematological and bone marrow examinations showed typical findings of C. H. S. syndrome (table II)

In the course of the disease, several aspirations were performed which yielded purulent fluid. Staphylococcus aureus was cultured from the effusion. Later the cervical, axillary and inguinal lymph nodes became enlarged, as well as the spleen and liver Anaemia developed and the general condition of the child deteriorated. Death occurred at the age of 48 days.

Of two female children born later to the same family one showed retardation in psychomotoric development and died at 6 months, without clinical or haematological evidence of C. H. S. syndrome. The other is at present 2 years old, and in good health.

Case 4 N A., male sibling of I. N (case 3) 4th child in the family was born albinoid. Physical examination revealed no pathological findings. However typical features of C. H. S. syndrome were found in peripheral blood and bone marrow smears.

At the age of 5 months the patient was hospitalized because of obstinate anorexia. Physical examination revealed enlarged spleen, palpable 3 cm below the costal arch. The edge of the liver was also palpable. Lymph nodes were not enlarged. The child exhibited photphobia, nystagmus and albinoid changes in the fundi. The haematological findings are summarized in table II The patient died suddenly on the 18th day of hospitalization without any apparent cause being revealed by autopsy

Results and Discussion

Morphological observations The morphology of cells in Chediak Higashi-Steinbrinck syndrome has already been described in early publications. Recently a detailed description was given by Undritz et al. (9) and Bessis et al. (10 11) made some interesting observations by phase contrast microscopy and also reported the first results of studies in the electron microscope. Characteristic findings in the blood are as follows azurophil inclusion bodies (revealed by May-Grünwald-Giemsa staining) in lymphocytes, giant granules in granulocytes and irregular inclusions in monocytes (fig 2)

In the bone marrow large cytoplasmic vacuoles were found in addition, in young granulocytes. These vacuoles were usually unstained but sometimes contained homogeneous yellow red inclusions. In others, irregular azurophil inclusions were seen, surrounded by a clear halo (figs. 3 and 4)

Earlier observations (12) have confirmed the presence of grey cytoplasmic inclusions of irregular or angular shape, observed by other authors, in granulocytes. These were previously confused with Doehle bodies, while some authors considered them to be a conglomerate of the specific granules (9) In our opinion these cytoplasmic inclusions differ from the specific granules of eosinophil and neutrophil granulocytes in May-Grünwald-Giemsa and other cytochemical stainings.

The presence of atypical mononuclear cells in the blood previously demonstrated (12) recurred in the present cases, leading to the belief that these cells are a manifestation of the disease, in the lymphatic system.

Opinion differs as to the nature of the immature vacuolated cells in the bone marrow UNDRITZ (9) believes them to be young phagocytes belonging to the monocytic series, whereas most other authors consider them to be immature granulocytes (promyelocytes) We found in cells of this type abundant azurophil granulation in the cytoplasm, which might develop later into specific granules of mature cells. The inclusions in the large vacuoles may be precursors of the irregular cytoplasmic inclusions found in mature granulocytes (figs. 2 and 3) These, precursors sometimes resembled erythrocytes, but staining by LEPEHNE s method (2) failed to confirm the presence of haemoglobin.

In general, no involvement of the erythroid cells was found in this syndrome. However we encountered a binucleated cell, having basophil cytoplasm and nuclear structure similar to that of normoblasts, containing a typical inclusion body' in the cytoplasm (fig 5) (see also HIGASHI, cited by UNDRITZ, 9)

Some authors have investigated the phagocytic function of white blood cells in this syndrome (13 14) It appears to be normal, so that the presence of anomalies in the cells apparently does not interfere with the phagocytic function. We have observed in the bone marrow a significant number of cells in mitosis, containing inclusions or even large granules. The anomalies in the cells seem also not to interfere with the mitotic process (figs. 3 and 4)

Table III
Cytochemical findings.

Method	Lymphocytes		Neutrophils		
	Cytoplasm	Inclusions	Cytoplasm	Specific granules	Inclusions
M.G.-Giemsa	Blue	Red-azur	Rose	Violet-pink	Grey
Peroxidase reaction	—	—	++	++	++
Peroxidase reaction for eosinophils	—	—	±	±	+
Acid phosphatase	++	—	++		—
Alkaline phosphatase	—	—	++	++	—
Sudan Black B	—	—	++	++	++
P. A. S.	+	+	+	+	+
Ptyalin + P. A. S.	—	+	—	—	+
Feulgen	—	—	—	—	—
M. G. Pyronin	+	—	±		
Toluidine blue	—	—	—		
Prussian blue reaction	—	—	—		
Haematoxylin	—	—		—	—

Cytochemical observations Staining for acid phosphatase revealed strong activity in monocytes and granulocytes. In the lymphocytes, enzyme activity was stronger than usual and was manifested often by the presence of brown granules located around the inclusion bodies, sometimes in annular form (fig 6) Strong alkaline phosphatase activity was also detected in the neutrophil granulocytes with a score of 258 (normal score 50 to 80) In some cells, unstained regions were noticed which did not reveal enzyme activity probably corresponding to the grey cytoplasmic inclusions (fig 7)

Staining for peroxidase revealed, in agreement with what has been found (9) strong activity in specific granules as well as in cytoplasmic inclusions in the granulocytes. Strong activity was also found in the cytoplasmic inclusions in monocytes. No activity what soever was found in the lymphocytes.

However peroxidase staining for eosinophils, as described by UNDRITZ (2) exhibited positive staining of the specific eosinophil granules as well as of the round cytoplasmic inclusions. In neutrophil granulocytes only the cytoplasmic inclusions were stained, and not the specific granules. Dark stained inclusions were found also in the cytoplasm of monocytes.

The PAS stain of HOTCHKISS colored the cytoplasm of neut rophil granulocytes in the peripheral blood a deep diffuse red, the

Table III (continued)

Eosinophils			Monocytes		Basophils	
Cyto-plasm	Specific granules	Inclu-sions	Cyto-plasm	Inclu-sions	Cyto-plasm	Specific granules
Blue	Yellowish red	Gray	Gray-blue	Gray	Pink	Blue-black
	+	+	+	++		
++	++	++	—	++		+
++	—	—	++	—		
—	—	—	—	—		
+	+	+	+	++		
+	+	+	±	+		
—	—	+	—	+		+
—	—	—	—	—		
—	—		+	—		
—	—		—	—		+
—	—		—	—		
	—	—		—		

cytoplasmic inclusions appearing pale rose in color In eosinophils, the inter-granular substance stained red, while the cytoplasmic inclusions were pale rose. The substance stained pale rose is obviously common to both types of cells. The inclusion bodies of the lymphocytes were also stained rose. The glycogen granules were stained deep red in about 3 / of the cells. In the monocytes, weakly stained cytoplasmic inclusions were seen. Pre treatment of the smears by ptyalin prevented the staining of glycogen inclusion bodies in the lymphocytes and cytoplasmic inclusions in the granulocytes resisted the effect of ptyalin. In bone marrow no staining was apparent in the erythroid cells and in the few plasma cells encountered. Weak positive staining was found in the vacuoles of some of the promyelocytes. The granulocytes were stained as in the peripheral blood. *The results of Sudan black B staining for fats were* identical with those reported by others a strongly positive reaction in granulocytes and in monocytes. The inclusion bodies of lymphocytes did not stain.

According to ASTALDI et al. (15) the PAS positive inclusions of cells consist of a lipoprotein. Disturbances in fat metabolism have also been reported, and glycolipid inclusions were found in histiocytes and in renal tubular cells in C.H S syndrome (16) Never

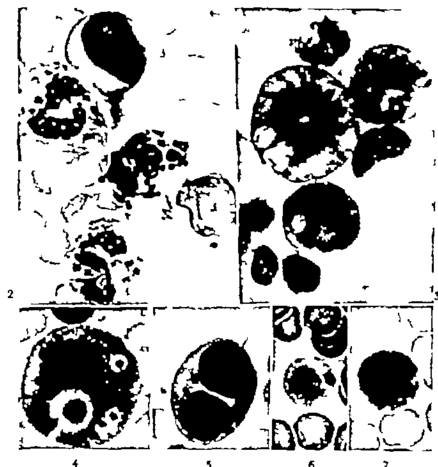


Fig 2 Neutrophil and basophil granulocytes. Lymphocyte with and without inclusion body (peripheral blood)
Fig 3 Immature granulocyte in mitosis, with vacuoles in cytoplasm. Mature eosinophil granulocyte with giant granules (bone marrow)
Fig 4 Dividing immature granulocyte with inclusions in cytoplasm (bone marrow)
Fig 5 Binucleated normoblast with inclusion body (bone marrow)
Fig 6 Lymphocyte with positive acid phosphatase staining (peripheral blood)
Fig 7 Mature granulocyte, alkaline phosphatase positive with unstained regions in cytoplasm (peripheral blood)

theless, the basic derangement of metabolic functions of cells which cause the present syndrome remains for the time being obscure.

Genetic observations The C. H. S syndrome has been known to have the following features of a recessive hereditary trait 1) A great proportion of the cases are descendents of consanguinous marriages

2) If there is plurality of children in the families involved, more than one child is usually affected

SANTOS SOBRINO AND MOURAO (17) mentioned the existence of a familial relationship between the two cases they present however no further details given In the present study it was possible to trace the pedigree of the two families concerned. The pattern of occurrence of the disease is typical of a hereditary trait, which is lethal in the homozygous condition, determined by one recessive gene.

In fig 1 the assumed transmission pattern throughout the successive generations in the families considered here is outlined. Due to the high frequency of consanguinity two pairs in which both parents were heterozygous and a typical Mendelian segregation occurred, are found. The expected ratio of involved homozygous children to total number of children for a trait determined by one recessive gene is 1 4 the observed ratio in these two families is 6 13 The assumption that the C. H S syndrome is determined by only one recessive gene is further supported by a consideration of the frequency of the disease in other cases reported in which there were more than two children in the family The number of affected children in these families was 25 out of a total of 69 (16) which is even higher than the expected number for a trait determined by one recessive gene Thus it is very unlikely that more than one major gene is required for the expression of the disease.

Certain authors (12, 18 19 16) have reported that the leucocytes of some parents or siblings of affected children displayed a typical granulation Typical inclusion bodies were also found in a small proportion of the lymphocytes in blood taken from the mother of cases 3 and 4 (fig 1 V 35) The possibility of identifying the heterozygotes should be further investigated. The development of a reliable method for their identification might be of great value in advising members of stricken families concerning the probability of occurrence of this disease in future offspring

Summary

Genetic, morphological and cytochemical observations in four cases of CHEDIAK-HIGASHI-STEINBRINCK syndrome are presented. The pattern of the syndrome in the pedigree of the families showed a Mendelian segregation typical of a hereditary trait determined by one recessive gene Morphological and cytochemical studies showed that the cytoplasmic inclusions in granulocytes differed from the specific granules Strong alkaline

phosphatase activity was demonstrated in mature neutrophil granulocytes of peripheral blood. Acid phosphatase activity was found in lymphocytes, located mainly around the inclusion bodies. Mitotic cells were found in the bone marrow containing inclusions and/or large vacuoles in the cytoplasm.

Résumé

Des observations génétiques, morphologiques et cytochimiques, faites dans 4 cas de syndrome de Chediak-Higashi-Steinbrinck sont décrites. Le mode d'hérédité du syndrome correspond à celui d'un gène récessif unique. Des études morphologiques et cytochimiques ont démontré que les inclusions cytoplasmatiques des granulocytes diffèrent des granulations spécifiques. Une forte activité de la phosphatase alcaline a été démontrée dans les granulocytes neutrophiles matures du sang périphérique. Une activité de phosphatase acide a été trouvée dans les lymphocytes, surtout aux alentours des inclusions. Dans la moelle osseuse, des cellules mitotiques contenant des inclusions et/ou de grandes vacuoles dans leur cytoplasme ont été trouvées.

Zusammenfassung

Es wird über genetische, morphologische und zytochemische Beobachtungen bei 4 Fällen von Chediak-Higashi-Steinbrinck-Syndrom berichtet. Der Erbgang zeigte das typische Verhalten eines hereditären, durch ein rezessives Gen determinierten Merkmals. Morphologisch und zytochemisch ließen sich die Zytoplasmaeinschlüsse der Granulozyten von den spezifischen Granula unterscheiden. Die reifen neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes zeigten eine deutliche Aktivität der alkalischen Phosphatase. Saure Phosphatase fand sich in Lymphozyten, vor allem in der Umgebung der Einschlußkörperchen. Im Knochenmark wurden mitotische Zellen nachgewiesen, deren Zytoplasma Einschlüsse und/oder große Vakuolen enthielt.

References

1. Cartwright, G. E.: Diagnostic, Laboratory Hematology, pp. 91 (Grune and Stratton, New York 1958).
2. Sandoz Atlas of Haematology, p. 28 (Sandoz, Basle 1952).
3. Kaplow, L. S.: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood *10:* 1023 (1955).
4. Rozenszajn, L.; Markhar, G. and Efrati, P.: Acid phosphatase activity in normal human blood and bone marrow cells as demonstrated by the Azo Dye method. Acta haemat. *30:* 310 (1963).
5. Consoli, C.; Pariante, F. e Schettini, F.: Aspetti citoistochimici delle cellule nel liquor in condizioni normali e patologiche. Acta neurol., Napoli *5:* 776 (1955).
6. Sheehan, H. L. and Storey, G. W.: An improved method of staining leucocyte granules with Sudan Black. J. Path. Bact. *59:* 336 (1947).
7. Kurnick, N. B.: Histological staining with Methyl-Green-Pyronin. Stain Technol. *27:* 233 (1952).
8. Dacie, J. V.: Practical Haematology, 2nd ed., p. 73 (Churchill, London 1956).
9. Hanson, H.; Lindell, F.; Nilsson, L. R.; Söderhjelm, L. and Undritz, E.: Die Chediak-Steinbrinck Anomalie resp. erblich-konstitutionelle Riesengranulation (Granulagiganten) der Leukozyten in Nordschweden. Folia haemat. *3:* 152 (1959).
10. Bessis, M.; Bernard, J. et Seligmann, M.: Étude cytologique d'un cas de maladie de Chediak. Nouv. Rev. franç. Hémat. *1:* 422 (1961).
11. Bernard, J.; Bessis, M.; Seligmann, M.; Chassigneux, J. et Chome, J.: Un cas de maladie de Chediak-Steinbrinck-Higashi. Presse méd. *68:* 563 (1960).

12. EFRATI, P AND JONAS, W Chediak anomaly of leukocytes in malignant lymphoma associated with leukemic manifestations: Case report with necropsy Blood *13*. 1063 (1958)
13. SARAIVA, L. G. AZEVEDO, M. CORREA, J CARVALHO, G. AND PROSPERO, J D : Anomalous panleukocytic granulation. Blood *14* 1112 (1959)
14 PAGE, A. R. BERENDES, H. WARNER, J AND GOOD, R. A. The Chediak Higashi syndrome Blood *20* 330 (1962)
15. ASTALDI, G. ET STROSSELLI, E. Histochimie des granulations géantes des polynucléaires dans l'anomalie de Chediak. Nouv Rev franç Hémat. *1* 626 (1961)
16. KRITZLER, R. A.; TERNER, J Y ; LINDENBAUM, J MAGIDSON, J ; WILLIAMS, R. PREISIG, R. AND PHILLIPS, G B. Chediak Higashi syndrome. Amer J Med. *36*. 583 (1964)
17 SANTOS SOBREIRO, B. MOURAO, G Sindrome de Chediak-Higashi Apresentacao de dois casos. J Pediat., Rio de Janeiro *24* 341 (1959)
18. DE BASTOS, O. RESENDE BARROS, O. Sindrome de Beguez Cesar-Steinbrinck Chediak Higashi. Sangre *5*. 367 (1960)
19 BEGUEZ CESAR, A. Neutropenia cronica familiar con granulaciones atipicas de los leucocitos. Bol. Soc. cub. Ped. *15*. 900 (1943)

Authors' address: Dr N. Sadan, Dr H. Ader and Dr. B. Streiber Kupat Holim, *Rehovot*; Dr D. Yaffe, the Weizmann Institute of Science, *Rehovot*; Dr L. Rozenszajn, Meir Hospital, Kfar Saba and Dr P. Efrati, Kaplan Hospital, *Rehovot* (Israel).

Acta haemat. 34 30–35 (1965)

Institute of Human Genetics (Head: Prof. W. Lehmann) and the Institute of Hygiene (Head: Prof. H. Gärtner) Dept. of Blood Transfusion (Chief: Dr. V. Sachs) University of Kiel

Familial Chronic Thrombocytopenia with Platelet Autoantibodies*

By D. Harms and V. Sachs

In 1951 Evans et al. (8) succeeded in proving platelet autoantibodies in the serum of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) the occurrence of thrombocytopenic autoantibodies having already been supposed by Evans and Duane (7) in 1949 when observing a combination of acquired haemolytic anaemia caused by autoantibodies against red blood cells with simultaneous thrombocytopenia. This observation important for the pathogenesis of ITP has repeatedly been confirmed since that time (5 16 21 13 3 18 20 4)

Evans et al. (7) were also the first authors to report on the familial occurrence (father and daughter) of ITP with platelet agglutinins (in the serum of the father) Without going into methodical details, Schaar (19) found agglutinins with part of the sick as well as of those who were not sick among the members of the family examined by her she concludes, however without giving a reason, that platelet antibodies should not be considered as aetiologic or pathogenetic factors of the disease. As far as we know there have not been made other statements yet about a familial ITP with platelet agglutinins, familial thrombocytopenic purpura (Werlhof) being only very rarely observed (for bibliographic data see 15)

We now had the occasion of examining a family with ITP and simultaneously occurring platelet autoantibodies. The proposita, a a 19-year-old girl, that gave rise to the examination has suffered since the twelfth year of her life from the bleeding disease The figure shows the pedigree of the examined members of the family The data of the clotting analysis and of the serological investigations as well as the methods employed are given in the table.

---

* Herrn Prof. Dr. W. Lehmann zum 60. Geburtstag in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet.

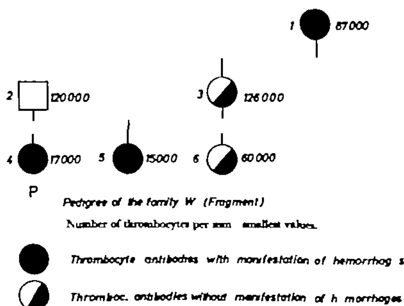


Fig 1

The tabulated data show that the proposita, R.W., and her two younger sisters, U W and G W., have a rather marked thrombocytopenia with platelet values partially below the critical limit of 30 000 mm The mother of the proposita as well as the grandmother on the mother s side and the three sisters have platelet antibodies, which were determined by means of the antiglobulin consumption test (2, 17 22, 23) None of the examined patients show an enlargement of the spleen or have had blood transfusions. With the sisters R. W and U W an activation of the fibrinolytic system was safely excluded by means of the fibrin plate method (1) *We have not stated an interaction between the* antiglobulin consumption and the degree of the thrombocytopenia or the manifestations of haemorrhages.

Interesting is the statement that *all* the examined patients—the father excepted—have a diminution of the clotting factor IX, which goes from a small degree to a rather great one. Beyond that, G W has an additional diminution of the clotting factor VIII The remarkable reduction of the clotting factor IX in familial ITP was

Table I

Name	Sex age (years)	Date of investigation	History of bleeding	Clinical findings	Rumpel Leede	Bleeding time (6)	Thrombocytes: Number of thrombocytes (9)	Thrombocytes: Agglomeration (12)
. B.	♀ 74	Nov 64	occasionally small hemorrhages of skin	ø	—	4 30"	87 000	—
D W W	♂ 47	Nov 64	ø	ø	—	4 30"	120 000	—
LW	♀ 45	Oct. 64	ø	ø	++	4 30"	126 000	ø
.W	♀ 19	July/Aug 62	since 1937 relapsing hemorrhages of skin	suggillations	positive	5' 20"	40 000 24 000 41 000	—
		Sept./Oct. 64	since April 64 larger hemorrhages of skin	numerous hemorrhages of skin	++	10' 30"	19 000 17 000	ø
		Dec. 64		sugillations	—	—	29 000	—
J W	♀ 16	July/Aug. 62	during infancy small hemorrhages of skin	ø	ø	<7'	54 000	—
		Sept./Oct. 64	since April 64 epistaxis	ø	++	10	15 000	ø
		Dec. 64	occasionally small hemorrhages of skin	ø	—	—	26 000	—
J W	♀ 12	Nov 64	ø	ø	+	6'	60 000	ø
			Normal values	ø	ø	<7	>100 000	ø 4

nd — not investigated, ø negative + positive, ++ strong positive

for the first time indicated by KRICK et al (14) but we do not know for sure yet whether it has a pathogenetic significance.

The repeated occurrence of thrombocytopenia and simultaneously of platelet autoantibodies in a family cannot be caused by accidental coincidence regarding the rarity of ITP In accordance with EVANS et al. (7) we presume that in these rare cases a familial hereditary disposition to the production of autoantibodies exists, just as there may be frequent familial cases with other diseases of an autoimmunological pathogenesis. Examinations of other family members are being initiated.

Table I (continued)

Antiglobulin consumption-test (2, 17, 22, 23) own platelets	platelets of others	Red cell anti-bodies	Blood group	Clotting analyses Howell-time (11)	FVIII (2)	FIX (24)	Thrombelastographie	k
6 steps 50%	5 steps 51%	ø	A CDe/c	2' 15	119%	32%	11 45	7'
ø	ø	ø	O CDE/c	2'	111%	65%	—	—
6 steps 55%	4 steps 43%	ø	A₁ CDe/c	1 45	70%	62%	12' 15	5
—	—	—	—	normal'	73%	50%	14 15	15
4 steps 36%	5 steps 25%	ø	O CDe/C	2'	150%	62%	17' 15	11
6 steps 53%	6 steps 41%		—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	87%	74%	21	13
6 steps 43%	4 steps 23%	ø	A₁ CDe/c	3'	133%	45%	21 15	12
6 steps 40%	5 steps 30%		—	—	—	—	—	—
6 steps 47%	6 steps 54%	ø	O CDe/C	1 30'	23%	37%	15' 45	10'
ø	ø	ø	—	<2' 15	>60%	>60%	15'	6'

Summary

Report on family with chronic idiopathic thrombocytopenia (ITP) and platelet autoantibodies (three sisters, the mother and the grandmother on the mother side) associated with diminution of the clotting factor IX. A familial hereditary disposition of autoantibodies is discussed.

Résumé

Rapport sur une famille (3 sœurs, la mère et grand'mère maternelle) souffrant d'une thrombocytopénie idiopathique chronique avec auto-anticorps antithrombocytaires, combinée à une diminution du facteur IX de la coagulation sanguine. Une disposition familiale héréditaire à la formation d'auto-anticorps est discutée.

Zusammenfassung

Bericht über eine Familie mit chronischer idiopathischer Thrombocytopenie (ITP) und antithrombocytären Autoantikörpern (drei Schwestern, Mutter und Grossmutter mütterlicherseits) in Verbindung mit einer Verminderung des Gerinnungsfaktors IX. Eine familiäre, auf Erbfaktoren beruhende Disposition zur Autoantikörperbildung wird diskutiert.

References

1. Astrup, T. and Mullertz, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. *40:* 346 (1952).
2. *Arzóny, L. und Stefanovic, V.* Der *Anti-Human-Globulin-Konsumptionstest bei* verschiedenen Krankheitsbildern. Folia haemat. (Lpz.) *80:* 67 (1963).
3. Aufdermauer, A. und Meyer, W. Immunhämatologische Untersuchungen bei Morbus Werlhof. Kasuistische Mitteilung. Helv. med. Acta *22:* 446 (1955).
4. Breddenbach, H.; Gruner, J. und Zierer, M. Nachweis und Verhalten thrombozytärer Antikörper bei Diagnostik und Therapie der chronischen idiopathischen thrombozytopenischen Purpura. Folia haemat. (Lpz.) *82:* 86 (1964).
5. Dausset, J.; Delafontaine, P. et Fleurot, Y. Agglutination et destruction «in vitro» des plaquettes normales pour le sérum d'une malade atteinte de purpura thrombopénique aigue. Inhibition par ce sérum de la rétraction du caillot normal. Sang *23:* 573 (1952).
6. Duke, W. W. The Pathogenesis of purpura haemorrhagica with especial reference to the part played by blood platelets. Arch. intern. Med. *10:* 445 (1912).
7. Evans, R. S. and Duane, R. T. Acquired hemolytic anemia. The significance of thrombocytopenia and leucopenia. Blood *4:* 1196 (1949).
8. Evans, R. S.; Takahashi, K.; Duane, R. T.; Payne, R. and Liu Chi-Kong. Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia. Arch. intern. Med. *87:* 48 (1951).
9. Fenerly, R., cf. Jürgens, J. und Beller, F. K. Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse, p. 127 (Thieme, Stuttgart 1959).
10. Hartert, H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin. Wschr. *26:* 577 (1948).
11. Howell, W. H. Prothrombin. Amer. J. Physiol. *35:* 474 (1914).
12. Jürgens, J., cf. Jürgens, J. und Beller, F. K. Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse, pp. 139, 323 (Thieme, Stuttgart 1959).
13. Kissmeyer-Nielsen, F. Demonstration of thrombocytopenic and leukopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenia and leucopenia. Acta haemat. (Basel) *9:* 337 (1953).
14. Kirck, W.; Jürgens, R. und Hiepler, E. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen beim familiären Morbus Werlhof. Klin. Wschr. *37:* 863 (1959).
15. Lehmann, W. in Becker: Hb. d. Humangenetik, Bd. III/2. Genetik der Blutkrankheiten (Thieme, Stuttgart 1965, in press).
16. Miescher, P.; Cruchaud, S. et Hässig, A. Nouvelles acquisitions concernant la pathogénèse de la thrombocytopénie essentielle. Helv. med. Acta *19:* 434 (1952).
17. Moullinier, J. Technique de la réaction de consommation d'antiglobuline. Rev. franç. Et. clin. biol. *1:* 355 (1956).
18. Pfeiffer, E. F.; Spielmann, W. und Ditschuneit, H. Die klinische Bedeutung des Nachweises von Antikörpern gegen Thrombocyten bei thrombopenischer Purpura. Dtsch. med. Wschr. *81:* 735 (1956).

19. Schaar, F. E. Familial idiopathic thrombocytopenic purpura. J. Pediat. 62 546 (1963)
20. Schäfer, K. H.; Fischer, K. und Landbeck, G. Thrombocytär bedingte hämorrhagische Diathesen. Dtsch. med. Wschr. 83 695, 756 (1958)
21. Stefanini, M., Dameshek, W., Chatterjea, J. B., Adelson, E. and Mednicoff, I. B. Studies on platelets IX. Observations on the properties and mechanism of action of a potent agglutinin detected in the serum of a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura (with a note on the pathogenesis of the disease). Blood 8. 26 (1953)
22. Steffen, C. und Schindler, H. Bericht über die Verwendung des Antihumanglobulin-Ablenkungsversuches für den Nachweis eines Antileukozyten-Antikörpers bei Agranulozytosen. Münch. med. Wschr. 97 469 (1955)
23. Steffen, C. Überblick und weitere Untersuchungen über Agranulozytosen und Leukopenien mit positivem Leukozyten-Antikörperbefund. Wien. Z. inn. Med. 37 245 (1956).
24. Wintersteiner, A.; Marbet, R. and Strähle, R. V. Congr. europ. Soc. Haemat., Freiburg (Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1956)

Authors' address: Drs. D. Harms and V. Sachs, Inst. of Human Genetics, Institute of Hygiene, Dept. of Blood Transfusion, Univ. of Kiel, *Kiel* (Germany)

Acta haemat. 34 36–43 (1965)

The Medical Clinic of the University of Milan (Director: Prof. L. Villa)

Investigations on the Chromosome Complement in Some Myeloproliferative Disorders

By G. B. Ponti, R. Valentini, P. M. Carrara and S. Eridani

The technical improvements introduced in the last years have greatly enhanced the investigation on the behaviour of the chromosomal pattern of human cells in several pathological conditions. In the field of myeloproliferative disorders the discovery of a typical chromosomal aberration in myelogenous leukemia, i. e. the presence of the Ph^1 chromosome, has been followed by extensive investigation with the aim to ascertain whether similar peculiarities were detectable in other disorders of the same nosographic group.

A few authors have reported changes of the chromosomal pattern in other myeloproliferative disorders which might be of theoretical value. These reports still need confirmation.

In myeloma and related disorders Bottura (3) reported one case of Waldenström' disease, in which nearly all the cells of bone marrow had 47 chromosomes with a well definite Extra-chromosome. Chromosomal alternations were also found by Castoldi (4) in one case of myeloma, but with no specific pattern. Lewis (16) and Bottura (2) reported a complete absence of chromosomal changes in cases of multiple myeloma. Only recently Lewis et al. (15) found in a case of plasmocytoma 12 mitotic figures (on 50) with variable degree of aneuploidy (50, 56 chromosomes) and a small percentage of polyploid cells.

In chronic lymphoadenosis Gunz et al. (10) reported 3 cases (in the same pedigree) in which a small acrocentric chromosome, supposed to be of the 21 group, was found with a nearly total absence of the short arms. This report was never confirmed in subsequent research (5, 8)

*In a patient with pernicious anaemia Astaldi (1) reported numerical and mor*phological changes of the chromosomal pattern in bone marrow cells. On the other hand Gräsbeck (7) and Court Brown et al. (6) did not observe any significant change in the same disease.

In acute leukaemia different results have so far been reported. Kemp et al. (13) found in a few cases a modal number between 47 and 49, with no specific morphological alterations: the quantitative changes seemed to disappear after treatment with antimetabolites. Kinlough et al. (14) reported 2 cases with an extra-chromosome of the 13–15 group. A modal number of 47 was described by Hungerford et al. (12) in 3 cases; the extra chromosome belonged to the 6–12 group. A similar observation was reported in 1 case

Table I
Acute leukaemia.

Case		Examination on	Karyotype						Total enumerated plates
			23	44	45	46	47	90	
1	P.A. ♀	Bone marrow	1	–		20	–	–	21
2	C.P ♀	Peripheral blood	–	1	1	32	–	–	34
3	R.P ♂	Bone marrow		1		22	–	–	23
4	P.F ♂	Bone marrow	–	–	1	27	–	4	32

Table II
Chronic myeloid leukaemia.

Case		Examination on	Karyotype					Total enumerated plates
			44	45	46	47	Ph	
5	G.V ♀	Bone marrow		1	16	–	16	17
6	O.G.♂	Bone marrow	1	–	24	–	24	25

Table III
Chronic lymphocytic leukaemia.

Case		Examination on	Karyotype			Total enumerated plates
			43	46	47	
7	G.B. ♂	Peripheral blood	1	28	–	29
8	P L. ♂	Bone marrow		19	–	19

by WEINSTEIN (19). FORD et al. found in 1 case modal number of 48, while few cells had only 47 chromosomes. In the latter ones only small metacentric chromosome was present, while in the 48-karyotype an extra-chromosome of the 6–12 group was also present (9) PEDORANO et al. (16) observed recently in 1 case modal number of 46, with absence of chromosome of the 1 3 group and somewhat larger extra-chromosome the finding was mainly present in the bone marrow and only in minor extent on the peripheral blood.

The present report deals with the results so far obtained in an investigation, which is still in progress at the Medical Clinic of the University of Milan. Chromosomal examination was performed usually in these studies on preparations from cultures of bone marrow and in some cases of peripheral blood.

Methods and Material

Bone marrow aspirate (1 ml) was added to Hank solutions (9 ml) and Na citrate (1 ml). Subsequently Colcemid was added (1 γ/ml) and the suspension placed at 37° for 90 minutes. The culture was then centrifuged at 1000 .p.m. for 10 minutes.

The supernatant was removed and 8 ml. of hypotonic solution (4 : 1 distilled water and Na citrate) were added. The mixture was then placed at 37° for 30 minutes.

The suspension was then centrifuged at 1000 p.m. for 5 minutes, the supernatant discarded and fixative added to the residual. The fixative solution was mixture of three parts of methanol to one part of acetic acid. After 30 minutes at room temperature the suspension was washed with the fixative until clean solution was obtained. Drops of this solution were spread on previously ice-frozen slide and then evaporated on faint flame such slides may be conserved indefinitely A short staining with diluted Giemsa solution was then performed.

For peripheral blood cell examination, heparinized blood sample was allowed to stand t room temperature for 1 hour Plasma was then discarded and TC 199 Difco Medium was added to the residual, to obtain dilution of 1500–3000 cells/mm³ Plasma concentration in the final suspension should be about 30° in volume. Bacto phytoagglutinin P Difco (0,1 cc/ml of cell suspension) and antibiotics, to prevent contamination, were also added the culture was then placed at 37° for 72 hours, with occasional agitations.

At the end of this period the culture was centrifuged at low speed for 5 minutes and the supernatant removed. Hypotonic solution (8 ml) was added, then the suspension centrifuged and resuspended in hypotonic solution Colcemid (1 γ/ml) was added and incubation continued at 37° for 90 minutes. The suspension was then treated as for the bone marrow preparation.

In the present investigation 16 cases of myeloproliferativ disorders were studied 4 cases of acute leukaemia, 2 cases of chronic myeloid leukaemia, 2 cases of chronic lymphocytic leukaemia, 6 cases of multiple myeloma and related disorders, 1 case of pernicious anemia and 1 case of polycythaemia vera.

Results

The results are reported in tables I – V The following remarks may be of some interest.

In three cases of *acute leukaemia* no chromosome abnormality was found. In case number 4 however some grossly hyperploid mitotic plates, similar to those found in multiple myeloma were observed (fig 1) It is of particular interest to note that the investigation was performed at the very beginning of the disease, when both the clinical picture and the haematological features were more consistent with a diagnosis of bone marrow hypoplasia and subsequent agranulocytosis. Diagnosis of acute leukaemia became possible only in the terminal stage of the disease when bone marrow and peripheral blood did show a stem-cell proliferation.

In the cases of *myeloid leukaemia* the presence of the Philadelphia chromosome in nearly all the plates was observed (fig 2) This morphological feature as already reported in the literature, is represented by a partial delection of the long arm of a chromosome in the group 21 22 The karyotype of one of these cases was studied during the period of therapeutically induced clinical and haemato-

Table II
Multiple myeloma and related disorders.

Case			Examination on	Karyotype							Total examined plates
				45	46	47	73	90	92	120	
9	Myeloma	F.T. ♀	Bone marrow		29	–	–	1	–	–	30
10	Myeloma	T.L. ♂	Bone marrow		38	–	1	–	–	1	40
11	Myeloma	M.R. ♂	Bone marrow		61	–	–		1	–	62
12	Myeloma	M.M. ♀	Bone marrow	1	28	–		–	2		31
13	Waldenstrom	M.N. ♂	Bone marrow	–	21	–	–	–	–	–	21
14	Reticulum-cell sarcoma	C.N. ♂	Bone marrow		28		–		1	–	29

Table I
Polycythaemia vera and pernicious anaemia.

Case			Examination on	Karyotype					Total examined plates
				44	45	46	47	92	
15	Polycythaemia	C.M. ♂	Peripheral blood		–	34		1	35
16	Pernicious anaemia	P.M. ♀	Bone marrow	1		161	–		162



Fig. 1 Case No. 4 Acute leukaemia two hyperploid cells.

logical remission. The persistence of the Ph^1 chromosome, at this stage of the disease, seems to stress the possible pathogenetic implication of this finding. The question of the disappearance of the chromosomal abnormality after effective treatment is still a matter of discussion, but, according to the majority of the authors, the chromosome complement remains abnormal even during remission (5–17).

No chromosome abnormality was observed in *chronic lymphocytic leukaemia.*

Fig. 2. Case No. 5. Chronic myeloid leukaemia (Ph_1 positive complement)

Fig. 2 bis. Karyotype of plate in fig. 2 (with Ph_1 chromosome)

Myeloma and related disorders in none of the cases studied peculiar chromosomal aberrations could be observed. Some occasional aneuploidism in these cellular lines (fig 3) does not seem to be related to normal variability of modal number Similar findings have indeed already been reported in cases of acute leukaemia and reticular sarcoma and recently also in cases of Burkitt s sarcoma (12) The anomalous chromosomal pattern which was sporadically observed in multiple myeloma does not imply the existence of abnormal cellular lines, but it seems merely an expression of occasional disturbances of cell replication, as it often happens in malignant tissues.



Fig 3. Case No 11 Multiple myeloma tetraploid complement.

The case of *pernicious anaemia* had just been diagnosed and was still untreated. A great amount of suitable plates could be observed the findings of a normal chromosome complement seems therefore to exclude, at least in this case, the existence of karyological alterations.

No chromosomal abnormalities were also found in the case of *polycythaemia*.

Conclusions

On the basis of the reported data the impression can be drawn that, apart from the findings of Ph[1] chromosome in chronic myeloid leukaemia, changes of the chromosomal pattern in myeloproliferative diseases are mainly aspecific, and far from constant. The findings of Bottura and Castoldi in myeloma and related disorders, of Gunz et al. in chronic lymphocytic leukaemia and of Astaldi et al. in pernicious anaemia were not confirmed.

A limited amount of mitotic plates with variable degree of aneuploidy and of polyploidy was however observed in some cases of myeloma and in one case of acute leukaemia. The meaning of these anomalies should not in our opinion be overemphasized as similar findings were occasionally observed in many cases of different neoplastic conditions.

A certain interest is anyway presented by the case number 4 (among acute leukaemias) in which chromosomal aberrations were detected in the initial stage of the disease, when a correct diagnosis was not yet established on the common routine examinations.

Accumulation of more data, still in progress, will allow more definite conclusions.

Acknowledgement The AA. wish to thank Miss E. Provera for invaluable technical assistance

Summary

Findings on the chromosomal pattern in some myeloproliferative disorders are reported. In plasmocytoma the results seem to exclude the presence of constant and typical changes, as reported by other authors, although occasionally abnormal mitotic plates were observed (as in other neoplastic conditions) I one case of preleukaemic stage of acute leukaemia, karyological anomalies could also be observed. The Ph[1] chromosome was observed in chronic myeloid leukaemia, also during remission.

Résumé

Nous rapportons nos observations sur les changements des chromosomes apparaissant dans certaines maladies prolifératives de la moelle osseuse. Dans le plasmocytome nos constatations semblent exclure la présence de changements constants et typiques, tels qu ils ont été rapportés par d autres uteurs. Occasionellement pourtant des mitoses anormales ont été observées (comme dans d' utres maladies néoplastiques) Dans un cas d état préleucémique d'une leucémie aigue, des anomalies de la mitose ont été observées. U chromosome Ph été observé dans une leucémie myéloide chronique, ainsi que durant la rémission de cett dernière

Zusammenfassung

Es wird uber das Chromosomenbild bei einigen myeloproliferativen Erkrankungen berichtet. Die Ergebnisse scheinen konstante und typische Veranderungen beim Plasmo-

zytom auszuschließen, wie sie von anderen Autoren beschrieben worden sind. Immerhin wurden gelegentlich abnorme Mitosen beobachtet wie bei anderen neoplastischen Krankheiten. Bei einem Fall einer präleukämischen Phase einer akuten Leukämie wurden ebenfalls karyologische Anomalien festgestellt. Bei chronischer Leukämie fand sich das Ph1-Chromosom, und zwar auch während der Remission.

References

1. Astaldi, G.: Sul corredo cromosomico nell'anemia perniciosa. Gazz. int. Med. Chir. 66: 2630 (1961).
2. Bottura, C. and Verga, M.: Chromosome abnormalities in Waldenström macroglobulinaemia. Lancet i: 1170, 1961.
3. Bottura, C.: Chromosome abnormalities in multiple myeloma. Acta haemat. 30: 274 (1963).
4. Castoldi, G. L. and Ricci, N.: Chromosomal imbalance in plasmacytoma. Lancet i: 829 (1963).
5. Court Brown, W. M.: Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. Lancet i: 986 (1964).
6. Court Brown, W. M.; Jacobs, P. A. and Doll, R.: Interpretation of chromosome counts made on bone marrow cells. Lancet i: 160 (1960).
7. De la Chapelle, A. and Gräsbeck, R.: Normal mitotic activity and karyotype of leucocytes from pernicious anaemia patients cultured in vitamin B_{12} deficient medium. Nature 197: 607 (1963).
8. Fitzgerald, P. M. and Gunz, F.: Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. Lancet ii: 150 (1964).
9. Ford, C. E. and Clarke, C. M.: Cytogenetic evidence of clonal proliferation in primary reticular neoplasms. Proc. 5th Cancer Conf., P. 129 (Academic Press, London 1963).
10. Gunz, F.; Fitzgerald, P. H. and Adams, A.: An abnormal chromosome in the lymph, leukaemia. Brit. med. J. i: 1097 (1962).
11. Hess, F. and Skriver, H.: Chromosomal abnormality and chronic lymphocytic leukaemia. Lancet i: 1109 (1964).
12. Hungerford, D. A. and Nowell, P. C.: Chromosome studies in human leukaemia. J. nat. Cancer Inst. 29: 545 (1962).
13. Kemp, N. H.; Stafford, J. L. and Tanner, R.: Chromosome studies during development of human leukaemia. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Lisboa 1963 (Karger, Basel/New York 1964).
14. Kinlough, M. A. and Robson, H.: Study of chromosomes in human leukaemia by direct method. Brit. med. J. ii: 1052 (1961).
15. Lewis, F. J. and Fraser, L.: An abnormal chromosomal pattern in myelomatosis. Lancet ii: 1014 (1963).
16. Lewis, F. J. and Mac-Taggart, M.: Chromosomal abnormalities in multiple myeloma. Lancet ii: 1183 (1963).
17. *Nowell, P. C. and Hungerford, D. A.: Chromosomal studies on normal and leukemic human leukocytes.* J. nat. Cancer Inst. 25: 85 (1960).
18. Pegoraro, L. and Pileri, A.: Anomalie cromosomiche in un caso di leucemia acuta con aplasia midollare. Haematologica 49: 712 (1964).
19. Weinstein, A. W. and Weinstein, E. D.: A chromosomal abnormalities in acute myeloblastic leukaemia. New Engl. J. Med. 268: 253 (1963).

Authors' address: Drs. G. B. Pena, R. Valentini, P. M. Carrara and S. Erdana, Medical Clinic, University of Milan, Via Francesco Sforza 35, Milan (Italy).

Acta haemat. 34 44–50 (1965)

From Department of Clinical Physiology Glostrup Hospital, Copenhagen

Metabolism of γG Globulin in Chronic Leukaemia

By Stig Bryde Andersen

The concentration of serum gamma globulin is frequently low in lymphatic leukaemia and increased in myeloid leukaemia. Little is known about the physiological factors responsible for these changes in the electrophoretic pattern Like all protein in the body gamma globulin is continuously being synthesized and broken down. The serum gamma globulin concentration therefore, is a reflection merely of this dynamic equilibrium A change in the serum concentration may thus be due either to a change in the production or to a change of the catabolic rate. In addition a change in the plasma volume might explain a change in serum gamma globulin concentration

The purpose of this study was to determine the metabolic factors responsible for the changes in serum gamma globulin in patients with chronic leukaemia. The metabolism of gamma globulin was determined by intravenous injection of the protein labelled with I^{131}

In studies of plasma protein metabolism it is necessary to employ pure and undenatured proteins. The gamma fraction of serum is not a pure protein but a mixture of the the immuno-globulins γG-globulin γM-globulin and γA-globulin Table I shows some physico-chemical characteristics of the immuno-globulins and the various synonyms used for the immuno-globulins. In the present paper the WHO-nomenclature has been employed (1) γG-globulin was used in the study because more than 80 % of the total amount of protein in the gamma fraction is comprised of γG-globulin. It is assumed that changes in the concentration of the total gamma fraction is due mostly to changes in the metabolism of γG-globulin.

Table I
Physicochemical characteristics of the immunoglobulins.

Data	Globulin		
	γG	γA	γM
Sedimentation constant	7 S	7 S	7 S
Molecular weight	160,000	160,000	1,000,000
Hexose content (%)	2.6	10.7	9.8
Synonyms	7S γ-globulin	β_{2A}-globulin	β_{2M}-globulin
	6.6S γ-globulin	β_{2}-globulin	19S-globulin
	γ-globulin	γ_{1A}-globulin	γ_{1M}-globulin
	γ_{ss}-globulin		γ-macroglobulin

Table II
Clinical data concerning 16 Patients with chronic leukaemia.

Patient no.	Diagnosis	Age in years and sex	Height cm	Weight kg	Haemoglobin g/l	Serum creatinine mg/l
1	Lymphatic Leukaemia	56, f	155	60.5	121	11
2	Lymphatic Leukaemia	66, f		48 0	78	9
3	Lymphatic Leukaemia	68, f	100	46.6	124	8
4	Lymphatic Leukaemia	72, f	165	63.7	124	11
5	Lymphatic Leukaemia	79 f	158	58.5	98	6
6	Lymphatic Leukaemia	51 m	172	63.9	90	11
7	Lymphatic Leukaemia	58, m	181	83 6	136	12
8	Lymphatic Leukaemia	70, m	165	59.2	100	9
9	Lymphatic Leukaemia	70, m	177	67 4	110	10
10	Myeloid Leukaemia	87 f		36.5	94	14
11	Myeloid Leukaemia	19 m	182	74 1	129	10
12	Myeloid Leukaemia	47 m		68.8	114	13
13	Myeloid Leukaemia	68, m	165	60.4	78	11
13 A	Myeloid Leukaemia	68, m	165	64.3	93	11
14	Myeloid Leukaemia	72, m	164	53.3	83	12
15	Myeloid Leukaemia	74, m	162	63.9	89	18
16	Myeloid Leukaemia	82, m	161	63.3	112	13

Methods

The study was carried out on 9 patients with lymphatic leukaemia and 7 patients with myeloid leukaemia. *Two studies were carried out on patient No. 13.* Data from the patients are shown in table II. They were aged 19 to 82 years and the duration of the disease after the diagnoses had been made varied from one month to 4 years. The diagnoses were based on the clinical picture and on the findings in peripheral blood and bone marrow. In addition lymph node biopsies were taken in most patients. Slight to moderate anaemia was present. Serum creatinine was normal except in patient no. 15.

γG-globulin was isolated from normal human serum by column chromatography on diethylaminoethyl cellulose. The protein was labelled with I^{131} by the iodine monochloride method (2). Further details on the preparation of I^{131} γG-globulin have been published previously (3).

Paper elec... carried out by the method of Laurell et al. (4 ... the metabol... ...bulin is lower than that of albumen by factor 0.8 ... the extinction ... ...obulin band was corrected by a factor 1.69 (= 1 ... before calcu... ...in fractions. Total serum protein concentrations were determined b... K...) ...

Experimen... ...ects received potassium iodide (500 mg day) for two days before injection of ... G-globulin and subsequently throughout the period of blood samples. T... sample was taken after 15 minutes. Subsequently daily urine collections a... ...amples were taken for a period of 10 to 26 days.

Analysis of ... ...ata were calculated according to the method of ... et al. (6 ... ...metabolism was calculated according to Matthews (... since serum ... ...erased. Both methods are based on the metabolic steady state and on ... t catabolism of the protein takes place intravascularly only. This ass... ...e justified for γG-globulin (8). The following parameters were calculated

Plasm... = injected dose × 0.98 / ...ma activity per ml after 15 min

The fact... (... the assumption that 2 ... of injected dose ... vascular comp... ... minutes.

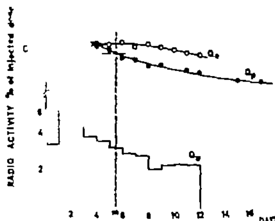


Fig. 1. Curves from turnover determination of γG-globulin in normal subject. Q_p = plasma curve. Q_u = daily urinary excretion of radioactivity; Q_e = activity in extravascular pools. m = equilibrium time.

$$\frac{Q_{e,m}}{Q_{p,m}} = \frac{E}{P} = d$$ ratio between extravascular and intravascular γG-globulin.

Plasma pool of gamma globulin = plasma volume × gamma globulin concentration. Fractional catabolic rate = % of plasma pool catabolized per day; Rate of synthesis = mass of gamma globulin synthesized per day. Total pool of gamma globulin = body mass of gamma globulin (plasma pool/distribution ratio). Distribution ratio = plasma pool as a fraction of the total pool. Mean life time = average time from the production till degradation of gamma globulin molecule (= 1/fractional catabolic rate × distribution ratio)

Table III

Data of γG-globulin metabolism in 16 patients with Chronic Leukaemia.

Patient no.	Plasma volume l	Serum-γ-globulin g/l	Plasma pool	Total pool	Fractional catabolic rate %/day	Mean life time days	Rate of synthesis g/day
1	2.71	5.5	15	26	3.1	57	0.5
2	4.20	5.9	25	50	4.0	50	1.0
3	1.98	5.7	11	24	7.4	29	0.8
4	2.84	9.7	27	57	9.1	23	2.5
5	2.46	34.4	85	184	13.4	16	11.3
6	3.52	3.5	12	21	3.6	51	0.4
7	4.15	7.8	32	53	4.7	35	1.5
8	4.00	7.4	30	63	12.8	17	3.8
9	3.70	13.4	51	115	6.3	36	1.7
10	2.25	14.4	32	65	9.6	21	3.1
11	3.74	17.8	67	115	5.4	32	3.6
1	4.02	13.9	56	95	11.0	15	6.1
13	4.88	10.2	50	94	9.8	19	4.9
13 A	4.24	10.7	45	87	6.1	32	2.8
14	3.59	33.6			8.5	26	
15	2.80	12.4	35	62	16.5	11	6.1
16	3.59	35.8	128	256	10.7	19	13.7
Normal range (8)	1.9–3.7	9.8–15.5	22–53	42–104	4.3–8.3	21–45	1.4–4.0
Normal mean (8)	2.8	12.7	36	69	6.9	29	2.5

paraproteinaemia.

Fig. 1 shows the curves from the determination of the metabolism of γG-globulin in normal subject. The urinary excretion of activity was lower on the first day of the study than on the following days. This was characteristic for all the metabolic studies, indicating that the labelled γG-globulin was not denatured. Characteristically the U/P ratio of activity after the first few days was found to be fairly constant throughout the period of investigation, indicating metabolic homogeneity of the labelled γG-globulin.

Results

Table III gives the results from the metabolic studies on patients with chronic leukaemia. The serum gamma globulin concentration was subnormal in 7 out of 9 patients with lymphatic leukaemia. In only three of these was the plasma pool of gamma globulin below normal. In these 3 patients the rate of synthesis was below normal and in none was fractional catabolic rate increased. Neither was the mean life time of the gamma globulin molecules below normal values. In fact, the fractional catabolic rate was either normal or subnormal and the mean life time was normal or above

normal The fractional catabolic rate was increased in two patients, but this was probably due to special circumstances which will be discussed later

In myeloid leukaemia the serum gamma globulin concentration was normal or increased. One patient had paraproteinaemia (no 14) It was impossible to determine the concentration of normal gamma globulin in this patient. The plasma pool of gamma globulin was normal in 3 patients and increased in the remaining 3 patients. The production of gamma globulin was increased in 4 patients.

In all patients the total body pool of gamma globulin varied almost parallel to the plasma pool, indicating that displacement of gamma globulin between intravascular and extravascular pools was not responsible for changes of the serum concentration.

Discussion

The frequency of hypogammaglobulinanaemia in lymphatic leukaemia has been reported as being from 19 % (9) up to 68% (10) Patients with chronic lymphatic leukaemia may be particularly susceptible to infection Those with frequent infections can usually be distinguished by their low serum gamma globulin (11) The level of serum gamma globulin seems to be related to the duration of the disease, tending to fall with the passage of time (12) It is known that some patients with chronic lymphatic leukaemia are incapable of forming antibodies on immunization (13) These findings are in accordance with the results of the present study since the major part of serum gamma globulin consists of circulating antibodies. The low serum gamma globulin was frequently due to a low production of gamma globulin. This was found in 4 patients out of 9 On the other hand a low serum gamma globulin is not always due to a low production, but may also be due to an increased plasma volume This seems to be the case in 3 patients in whom the plasma pool of *gamma globulin was within normal limits in spite of a low serum* concentration. Plasma volume is frequently increased in anaemia. Lymphatic leukaemia is often associated with anaemia, and this explains why patients with lymphatic leukaemia tend to have an increased plasma volume. In no patient was a subnormal plasma pool due to an increased fractional catabolic rate. This parameter however was increased in two patients. One (no. 8) had a normal plasma pool and a rather high production of gamma globulin He had continous fever toxic polyneuritis, moderate anaemia, abdomi

nal pains and was apparently in a hypercatabolic state. This may explain the increase in fractional catabolic rate. The other patient (no. 5) had a marked increase in serum gamma globulin. She had had bronchial asthma and chronic bronchitis for many years, probably causing the hypergammaglobulinaemia, the increased catabolic rate, and the high rate of synthesis.

GOLDEN et al. (13) studied the metabolism of I^{131} labelled gamma globulin in patients with chronic lymphatic leukaemia. The nature of the gamma globulin preparation was not specified and the metabolic homogeneity of the labelled gamma globulin cannot be judged from their data. Plasma half life averaged 13.9 days in 15 patients with lymphatic leukaemia and 6.6 days in 6 patients with breast cancer. They concluded that the synthetic as well as the catabolic rate is decreased in patients with lymphatic leukaemia. This conclusion is partly consistent with the data of the present study. However, the plasma disappearance half life reported by GOLDEN et al. is much shorter than those of the present study.

In myeloid leukaemia the hypergammaglobulinaemia was due to an increase in the rate of synthesis of gamma globulin. In none of the patients was a high gamma globulin due to a low plasma volume. In two patients an increased rate of synthesis was counterbalanced by an increase in fractional catabolic rate and a corresponding decrease in the mean life time of the gamma globulin molecules, so that the plasma pool of gamma globulin was normal. In no patients was a high concentration due to a decreased catabolic rate. The fractional catabolic rate was above normal in 4 patients and the mean life time of the gamma globulin molecules was shorter than normal. The increased rate of synthesis of gamma globulin is consistent with the finding that some patients with myeloid leukaemia are better antibody producers than patients with lymphatic leukaemia (13).

Summary

The metabolism of γG-globulin was studied in 9 patients with chronic lymphatic leukaemia and in 7 with chronic myeloid leukaemia. The low serum gamma globulin in lymphatic leukaemia was due either to haemodilution on account of an increase in plasma volume or to low production of gamma globulin. In myeloid leukaemia the rise in serum concentration was due to increased production. No patient with myeloid leukaemia had decrease in the catabolic rate of gamma globulin.

Résumé

Chez 9 malades souffrant d'une leucémie lymphatique chronique et chez 7 malades souffrant d une leucémie myéloïde chronique, le métabolisme des γ-globulines

a été étudié. Dans la leucémie lymphatique, l'hypogammaglobulinémie était causée soit par une dilution du sang à la suite d'une augmentation du volume plastique, soit par la diminution de la formation des γ-globulines. Dans la leucémie myéloïde, l'augmentation de la concentration plasmatique des γ-globulines était due à une production accrue. Aucun malade ayant une leucémie myéloïde n'avait de diminution de la vitesse d catabolisme des globulines.

Zusammenfassung

Bei 9 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und bei 7 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurde der Umsatz von γG-Globulin untersucht. Bei lymphatischer Leukämie war die Hypogammaglobulinämie entweder durch Blutverdünnung infolge Zunahme des Plasmavolumens bedingt oder durch eine verminderte Bildung von γ-Globulinen. Bei myeloischer Leukämie war die Erhöhung der Serumkonzentration auf eine gesteigerte Produktion zurückzuführen. Kein Patient mit myeloischer Leukämie wies einen verminderten Abbau von γ-Globulinen auf.

References

1. Ceppellini, R. Nomenclature for human immunoglobulins. Bull. WHO 30: 447 (1964)
2. McFarlane, A. S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. Nature 182. 53 (1958)
3. Andersen, S. B. Metabolism of gamma$_{ss}$ globulin in secondary hypogammaglobulinaemia. Amer. J. Med. 35. 708 (1963)
4. Laurell, C. B. Laurell, S. and Skoog, N. Buffer composition in paper electrophoresis. Considerations on its influence with special reference to the interaction between small ions and proteins. Clin. Chem. 2. 99 (1956)
5. Laurell, C. B. Paper electrophoretic pattern after protein staining. Acta. med. scand. Suppl. 367 9 (1961).
6. Pearson, J. D. Veall, N. and Vetter, H. A practical method for plasma albumin turnover studies; in Fellinger and Höfer Radioakt. Isotope Klin. Forsch., Vol. 3 Sonderband Strahlentherapie, p. 290 (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1958)
7. Matthews, C. M. E. The theory of tracer experiments with I^{131}-labelled plasma proteins. Phys. Med. Biol. 2: 36 (1957)
8. Andersen, S. B. Metabolism of gamma$_{ss}$ globulin (7S gamma globulin) in normal subjects and in cirrhosis of the liver in Fellinger and Höfer Radioakt. Isotope Klin. Forsch., Vol. 6 Sonderband Strahlentherapie, p. 303 (Urban & Schwarzenberg, München 1965)
9. Videbaek, A. Some clinical aspects of leukaemia. Acta haemat. 24 54 (1960).
10. Hudson, R. P and Wilson, S. J Hypogammaglobulinaemia and chronic lymphatic leukaemia. Cancer 13 200 (1960)
11. Miller, D G. and Karnofsky D A. Immunologic factors and resistance to infection in chronic lymphatic leukemia. Amer J Med. 31 748 (1961)
12. Fairley G M. and Bodley Scott R. Hypo-γ-globulinaemia in chronic lymphatic leukaemia. Brit. Med. J ii: 920 (1961)
13. Barr, M. and Fairley G. M. Circulating antibodies in reticulosis. Lancet i: 1305 (1961).
14. Golden, R. L. Miller, D G. and Diamond, H. D γ-globulin metabolism in chronic lymphocytic leukemia. J Cancer Inst. 29· 443 (1962).

Author's address: Dr. S. B. Andersen, Dept. of Clinical Physiology, Glostrup Hospital, Copenhagen (Denmark).

Acta haemat. 34 51–63 (1965)

Aus der Med. Univ. Klinik Freiburg i. Br. (Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)
Abt. Blutspendedienst (Leiter: Dr. M. Matthes)

Die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrozyten im niederfrequenten Bereich

Von N. Kleine und W. Burgam*

In früheren Arbeiten konnte Kleine zeigen, daß der elektrische Widerstand von Erythrozytensäulen bis zu einem Sättigungswert als Funktion der Zentrifugierzeit und der Zentrifugalbeschleunigung bei Messung mit niederfrequentem Wechselstrom zunimmt (1, 2). Hierbei verlief die zeitliche Zunahme des Widerstandes während des Zentrifugierens kinetisch wie eine Reaktion erster Ordnung, da der Differentialquotient dR/dt proportional R ist (R = Widerstand, t = Zeit).

Die Erythrozytenmembran besitzt gegenüber niederfrequentem Wechselstrom einen sehr grossen Blindwiderstand, daher kann das Zellinnere keinen Leitfähigkeitsbetrag liefern (3). Der Widerstand der gepackten Zellen kann also nur noch durch die Leitfähigkeit der Zelloberfläche und/oder der extrazellulären Kapillaren bedingt sein. Zur Abklärung dieser Frage und zum Studium weiterer Erythrozyteneigenschaften wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

Methodik

Als zentrifugierbare Meßzellen wurden Glasröhrchen von 70 mm Länge mit 1,9 bis 2,9 mm lichter Weite gewählt, in deren einem Ende eine Platinelektrode eingeschmolzen war. Die zu untersuchenden Erythrozytenaufschwemmungen wurden durch leichte Zentrifugation angereichert und mittels Pasteur-Pipette in die Meßzellen überführt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 12000 xg in einer entsprechend abgeänderten Mikrohämatokritzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen). Zur Messung des elektrischen Widerstandes wurde nach der Zentrifugation eine zweite Platinelektrode von oben her in die Meßzelle geführt, bis ein bei allen Untersuchungen einer Serie konstant gehaltener Elektrodenabstand herrschte (im allgemeinen 45 mm). Die Messungen wurden unter

* Teile dieser Arbeit wurden in der Dissertation von W. Burgam, Freiburg i. Br. abgehandelt.

temperaturkonstanten Bedingungen (37 °C) mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät durchgeführt (Fa. wissenschaftl.-techn. Werkstätten, Weilheim/Obb., Typ LBR)

Um entscheiden zu können, ob zwischen den Elektroden einheitliche Bedingungen herrschen, wurde bei einer Meßreihe jeweils dieselbe Erythrozytenaufschwemmung für 10 min und 40 min zentrifugiert und anschließend der elektrische Widerstand als Funktion des Elektrodenabstandes gemessen.

Ergebnisse

Aus Abb. 1 geht hervor daß bei einer optimalen Packung nach 40 min Schleuderzeit der Widerstand linear mit dem Abstand der Elektroden zunimmt, wogegen nach 10 min bei den größeren Elektrodenabständen deutlich geringere Widerstandszunahmen zu verzeichnen sind. Wertet man die Differenz beider Verläufe entsprechend aus, so ergibt sich eine lineare Zunahme der Differenz *zwischen optimaler und noch nicht vollständiger Packung der* Zellen.

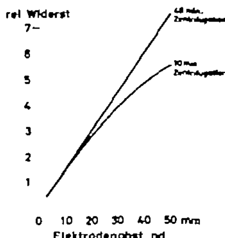


Abb. 1 Abhängigkeit des elektr Widerstandes gepackter Erythrozyten vom Elektrodenabstand nach 10 mm Zentrifugation bei 12000 × g und nach optimaler Packung.

Nimmt man an, daß die Leitfähigkeit von optimal gepackten Erythrozyten in der Hauptsache durch kapillare Zwischenräume bedingt ist, so müßte sich bei Änderung der Leitfähigkeit des Überstandes eine entsprechende Änderung des Widerstandes der Erythrozytensäule zeigen. Es wurde daher die Meßtemperatur und die Leitfähigkeit des Suspensionsmediums variiert, wobei bei geringeren Salzkonzentrationen die Isotonie durch Sorbit bzw Saccharose wiederhergestellt wurde.

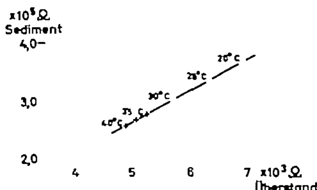


Abb. 2 Verlauf des Widerstandes gepackter Erythrozyten als Funktion des Widerstandes des Suspensionsmediums durch Veränderung der Meßtemperatur

Der Hämatokrit wurde für diese Untersuchung auf etwa 40 / eingestellt und nach der Zentrifugation für 40 min bei 12000 ×g zunächst der Überstand abgehoben, dann bei einem Elektrodenabstand von 20 mm der Widerstand der Erythrozytensäule gemessen und anschließend nach guter Säuberung und Trocknung der gleichen Meßzelle der Widerstand des abgehobenen Überstandes bestimmt. Auf diese Weise wurden die eventuellen Fehler durch Verschiedenheit der Meßzellen und durch Änderung des Ionengleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärer Phase während des Zentrifugierens ausgeschaltet. Wie Abb. 1 zeigt, ist die Verringerung des Elektrodenabstandes auf 20 mm nach der optimalen Packung ohne Belang, da es hier nur auf das relative Verhalten der Widerstände vom Überstand zur Erythrozytensäule ankommt.

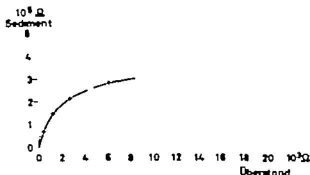


Abb. 3. Widerstand der Erythrozytensäule als Funktion des Widerstandes des Überstandes. Isotonieeinstellung mit Sorbit bzw. Saccharose. Meßtemp. 37 °C.

Abb. 2 zeigt, daß eine Änderung der Meßtemperatur eine Widerstandsänderung um ca. 2 % pro C bedingt. Es resultiert etwa der gleiche relative Verlauf wie für das Plasma oder für den entsprechenden Überstand, da sich die einzelnen Meßpunkte durch eine Gerade annähern lassen.

In Abb. 3 sind die Widerstände der Erythrozytensäule als Funktion der Widerstände des Überstandes über einen weiten Bereich wiedergegeben. Hieraus ergibt sich, daß der Verlauf einen Sättigungswert anstrebt. Bei diesem Sättigungswert weisen die gepackten Erythrozyten eine Leitfähigkeit auf, die im Mittel (58 ± 1 4) % vom Meßwert bei Aufschwemmung in isot. NaCl beträgt. Da in der Umgebung des Sättigungswertes die Widerstände des Suspensionsmediums keinen Einfluß auf die Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten ausüben, muß dieser Wert einen konstanten Widerstand darstellen, der schematisch parallel zum Widerstand liegt, welcher vom Suspensionsmedium abhängt. Werden die gemessenen Werte der Abb 3 hinsichtlich dieses Befundes entsprechend korrigiert, so ergibt sich eine Gerade, die eine lineare Abhängigkeit der Widerstände des Erythrozytensedimentes und des Suspensionsmediums nachweist (Abb 4) Die Leitfähigkeit der Zellsäule beträgt dann nur (0 45 ± 0 02) % der des Suspensionsmediums.

Die Erythrozytenmembran weist im pH Bereich von 6–8 unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Viskosität und Anionenpermeabilität auf, obwohl der isoelektrische Punkt bei etwa 1 8 liegt (4,5) Es wurde daher auch hier der Einfluß der

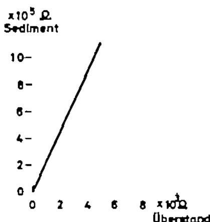


Abb. 4 Verlauf des Widerstandes der Erythrozytensäule in Abhängigkeit vom Suspensionsmedium nach Korrektur der Meßwerte mit dem Sättigungswert nach Abb. 3.

Wasserstoffionenkonzentration gemessen. Bei pH 6,7 ergab sich ein breites Maximum und bei pH 6,2 ein schmales ausgeprägtes (Abb 5) Die Untersuchung mit geringen Ionenkonzentrationen scheiterte an der ungenügenden Pufferkapazität gegenüber der der Erythrozyten, wodurch eine Änderung des konstanten Parallelwiderstandes nicht bestimmt werden konnte.

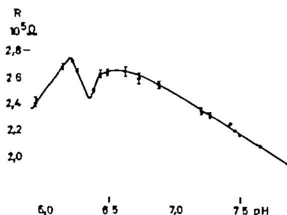


Abb 5. Abhängigkeit des Widerstandes der Erythrozytensäule vom pH Wert der Aufschwemmung Meßtemp. 37 °C.

Einige proteolytische Enzyme werden dazu benutzt, menschliche Erythrozyten zum Nachweis kompletter Antikörper vorzubereiten (6, 7) und es wurde wiederholt nachgewiesen, daß diese Enzyme eine Verminderung der Oberflächenladung des Erythrozyten beim Suspendieren in neutralem Puffer bewirken (5 8, 9 10) Darüber hinaus konnte über eine starke Verminderung der Potentialschwelle für die Anionenpenetration durch das Andauen der Erythrozytenoberfläche berichtet werden (1) Die Änderung des elektrischen Widerstandes der gepackten Erythrozyten nach Behandlung der Zellen mit Papain und Bromelin gegenüber den Kontrollen (Methodik nach 10) zeigt Tabelle I.

Tabelle I

Widerstandsabnahme der Erythrozytensäule nach enzymatischer Behandlung der Zellen gegenüber Kontrollen.

Papain	53 ± 5%
Bromelin	63 ± 6%

Zur Beantwortung der Frage, ob sich der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand durch das Andauen mit verändert, wurden Messungen entsprechend den in Abb. 2 dargestellten Ergebnissen angeschlossen, indem die Leitfähigkeit des

Tabelle II

Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes auf Grund von Behandlung der Erythrozytenoberfläche mit proteolytischen Enzymen gegenüber den Kontrollen.

Papain	56 ± 7%
Bromelin	63 ± 6%

Suspensionsmediums variiert wurde. Aus der Tabelle II geht hervor, daß sowohl Papain als auch Bromelin eine signifikante Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes verursacht.

Errechnet man aus den Meßwerten den Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit, so ergibt sich, daß bei den enzymatisch behandelten Erythrozyten die Leitfähigkeit der gepackten Zellen gegenüber der des Suspensionsmediums ebenfalls geringer ist als bei den Kontrollen (Tabelle III). Aus den Werten der gemessenen Widerstände ergibt sich, daß die Widerstandserhöhung der gepackten Zellsäule bei Suspension in physiol. Kochsalzlösung nach Behandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen durch die Erhöhung des vom Suspensionsmedium unabhängigen als auch abhängigen Widerstandes verursacht wird. Dies bedeutet, daß die beiden Widerstandskomponenten der Erythrozytensäule nicht voneinander unabhängig durch die Enzymenbehandlung verändert werden.

Es ist bekannt, daß sich einige hydrophile Kolloide leicht an die Erythrozytenmembran anlagern, wobei der Exponent der Freundlichschen Adsorptionsisothermen über 1 liegt, was für eine Mehrschichtadsorption spricht. Zur Untersuchung des Einflusses der adsorbierten Schichten auf den Widerstand der gepackten Erythrozyten wurden die Erythrozyten in einem Suspensionsmedium gewaschen, welches einmal 10 g Kollidon (K 60, Firma BASF, Ludwigshafen) pro 100 ml und zum anderen 10 g Dextran (FDR 931, Fa. Knoll, Ludwigshafen) pro 100 ml enthielt. Aus Tabelle IV geht hervor, daß der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand bei Kollidon um 52 % gegenüber den Kontrol

len erhöht ist, wogegen der Dextranzusatz keinen signifikanten Einfluß ausübt.

Tabelle III

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten von der Leitfähigkeit des Überstandes nach Behandlung der Membranen mit proteolytischen Enzymen.

Isot. NaCl	0,38 ± 0,02%
Papain	0,24 ± 0,03%
Bromelin	0,23 ± 0,02%

Tabelle IV

Veränderung des vom Suspensionsmedium unabhängigen Widerstandes durch Zusatz von 10% Dextran und 10% Kollidon zum Suspensionsmedium gegenüber den Kontrollen.

Kollidon	+ 52 ± 2%
Dextran	— 1,2 ± 2%

Den prozentualen Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit gibt Tabelle V wieder. Hiernach ist auch nur beim Kollidon eine Änderung gegenüber den Kontrollwerten zu verzeichnen. Ebenso wie bei der Enzymbehandlung ist auch hier die Änderung des Gesamtwiderstandes der Zellsäule durch eine Erhöhung des vom Suspensionsmedium abhängigen als auch unabhängigen Widerstandes verursacht.

Tabelle V

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit des Überstandes bei Zusatz hydrophiler Kolloide.

Isot. N Cl	0,48 ± 0,02%
Kollidon	0,27 ± 0,05%
Dextran	0,48 ± 0,02%

Blutgruppenspezifische Antiseren führen bei Erythrozyten mit entsprechenden Antigenen zu einer ausgeprägten Agglutination, wobei die makromolekularen Antikörper zu einem Zusammenhaften der Zellen führen. Ob hierdurch die elektrische Leitfähigkeit der Erythrozytensäule beeinflußt wird, sollten nachstehende Untersuchungen ergeben. Hierzu wurde dem Suspensionsmedium entsprechendes, gegen aqua bidest. dialysiertes Antiserum zugegeben. Die Agglutinationsstärke war im serologischen Sinne ++. Der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand war bei den

untersuchten Serumzusätzen nicht signifikant gegenüber den Kontrollen verändert (Tabelle VI) Hingegen wird durch die Antiseren nur der vom Suspensionsmedium abhängige Widerstand eindeutig erniedrigt (Tabelle VII)

Tabelle VI

Vom Suspensionsmedium unabhängiger Widerstand $\times 10^{3}\,\Omega$ (Sättigungswert) bei Zusatz von Antiserum.

Anti-A	3,75 ± 1,2
Anti-B	3,7 ± 0,1
Kontrolle	3,63 ± 0,1

Tabelle VII

Prozentualer Anteil der nur vom Suspensionsmedium abhängigen Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten von der Leitfähigkeit des Überstandes bei Zusatz von spezifischen Antiseren.

Anti-A	0,51 ± 0,04%
Anti-B	0,78 ± 0,03%
Kontrolle	0,38 ± 0,02%

Xylit wirkt in hohen Konzentrationen hämolysefördernd, obgleich der Stoffwechsel des Erythrozyten nicht nachteilig beeinflußt wird (11) Es wurde daher vermutet, daß durch Xylit die Stabilität der Zellmembran verändert wird Zum Studium des Einflusses von Xylit auf die Leitfähigkeit der gepackten Erythrozyten wurden Suspensionsmedien aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von isot. Xylit und isot. NaCl-Lösung hergestellt. Aus Abb. 6 geht hervor daß auch bei diesem Versuchsansatz der Kurvenverlauf offenbar einem Sättigungswert zustrebt, jedoch ist sein Wert gegenüber dem in Abb. 3 um ein Vielfaches größer

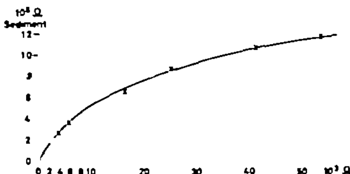


Abb. 6. Widerstand der Erythrozytensäule als Funktion des Widerstandes des Überstandes. Isotoniedarstellung mit Xylit. Meßtemp. 37 °C.

Bekanntlich erleiden die Erythrozytenmembranen während der Lagerung erhebliche Veränderungen, die sich auch auf den Widerstand der gepackten Zellen auswirken. In Abb. 7 sind die Mittelwerte aus 5 Konserven dargestellt. Demnach erfolgt der steilste Abfall des Widerstandes zwischen dem 7. und 15. Tag nach der Blutentnahme, um dann zu einem weniger starken Abfall überzugehen.

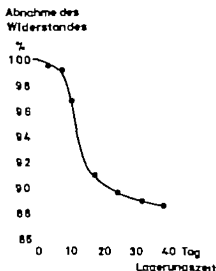


Abb. 7. Änderung des Widerstandes gepackter Erythrozyten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Vollblutkonserven bei +4 °C.

Diskussion

Da der elektrische Blindwiderstand der Erythrozytenmembran für niederfrequenten Wechselstrom bedeutend größer ist, als den gemessenen Werten für die Erythrozytensäule entspricht, weisen die Befunde nach Abb. 3 und 4 darauf hin, daß sich der Gesamtwiderstand der Zellsäule aus 2 Komponenten zusammensetzt.

Der vom Suspensionsmedium abhängige Widerstand ist durch die Leitfähigkeit kapillarer Zwischenräume zwischen den einzelnen Erythrozyten zu deuten, wobei sich diese Zwischenräume nicht durch ein längeres Zentrifugieren, selbst bei relativ hohen g-Zahlen, vermindern lassen, wenn die optimale Packung der Zellen erreicht ist. Der Widerstand der Zellensäule ist dann nicht mehr zu erhöhen. Demnach reichen die bei 12000 × g entstehenden Zentrifugalkräfte nicht aus, um die Erythrozytenoberflächen restlos anzu

nähern. Es müssen daher entweder starke Kräfte existieren, die eine innige Berührung der Zelloberflächen verhindern, was jedoch durch die vorhandenen elektrischen Ladungen nicht erklärt werden kann, oder aber die Erythrozyten werden von einer Hülle umgeben, die so fest mit den Membranbausteinen verankert ist, daß sie sich nicht abschleudern läßt. Eine derartige Hülle ist z. B. durch die Hydratation der in der Membranoberfläche vorhandenen hydrophilen Kolloide gegeben.

Im isoelektrischen Punkt weisen die Kolloide bekanntlich einen minimalen Hydratationsgrad auf, was sich in manchen physikalisch-chemischen Eigenschaften äußert. So konnte z. B. KLEINE (1) schon früher zeigen, daß bei pH 6,7 die Viskosität von Erythrozytenaufschwemmungen ein Minimum durchläuft. Wird hierbei nämlich konstanter Hämatokrit vorausgesetzt, so können gewaschene Zellen mit ihrer glatten Oberfläche keine Viskositätsänderungen bei verschiedenem pH-Wert hervorrufen, wenn nicht Molekülschwärme eine Vernetzung zustande bringen, die je nach Hydratationsgrad eine unterschiedliche Stärke aufweisen.

Ferner ergab sich bei früheren Untersuchungen, daß der Ladungszustand der hydrophilen Kolloide die Potentialschwelle für die Anionenpermeabilität der Erythrozyten beeinflußt, die ebenfalls bei pH 6,7 und andeutungsweise auch bei pH 6,2 einen Minimalwert besitzt (1). Bei der Messung des Widerstandes der Zellsäule in Abhängigkeit vom pH-Wert ergab sich auch hier ein Maximum bei pH 6,7 und bei pH 6,2.

Ein weiterer Hinweis auf die Hydratation der Zelloberfläche ergibt sich durch die Erhöhung des Widerstandes nach Behandlung der Zellen mit proteolytischen Fermenten. Diese Enzyme verursachen neben einer integralen Ladungsverminderung der Erythrozytenoberfläche auch ein Herauslösen von N-Acetyl-neuraminsäurehaltigen Mucoiden (12) und bewirken eine starke Erniedrigung der Potentialschwelle für die Anionenpermeabilität (1). Auf Grund des Verlustes der Membran an hydrophilen Mucoiden läßt sich somit die Widerstandserhöhung durch eine Verminderung der Hydrathülle des Erythrozyten erklären.

Der vom Suspensionsmedium unabhängige Widerstand ist durch eine konstante Eigenleitfähigkeit der Erythrozyten deutbar, da sich dieser Widerstand nicht durch die Leitfähigkeit des Suspensionsmediums beeinflussen läßt. Ferner bleibt dieser Wider-

stand unverändert, wenn auf Grund des Zusatzes von agglutinierenden Antiseren die interzellulären Zwischenräume im obigem Sinne vergrößert werden.

Hingegen verringert sich die Eigenleitfähigkeit der Erythrozytenoberfläche durch die Veränderungen der Membran auf Grund enzymatischer Behandlung oder durch Adsorption von Kolloiden. Nach den Versuchsergebnissen bewirkt eine Verringerung der Eigenleitfähigkeit der Erythrozytenmembran auch eine Verminderung der interzellulären Zwischenräume, so daß offenbar ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Eigenleitfähigkeit der Membran und der Hydratation hydrophiler Kolloide zu bestehen scheint.

Diese Befunde sind für mancherlei Untersuchungen bedeutungsvoll, da durch die hier angeführten Messungen Aussagen über den Hydratationsgrad und den Mindestabstand der Erythrozytenoberflächen gemacht werden können. So ist z. B. die Möglichkeit gegeben, ohne Zusatz von Farbstoffen oder radioaktiv markierten Substanzen, die alle auf Grund gewisser Anlagerungsfähigkeiten von den Erythrozyten adsorbiert werden, die Größe der zwischen den Zellen nach der Zentrifugation eingeschlossenen Flüssigkeitsmenge («Trapped-Plasma») zu bestimmen. Nach den hier geschilderten Untersuchungen ist der nur von der Leitfähigkeit des Suspensionsmediums abhängige Widerstand streng proportional dem Kehrwert der eingeschlossenen Flüssigkeitsmenge, so daß nach optimaler Packung der Zellen nur $(0{,}45 \pm 0{,}02)$ / des Erythrozytenvolumens als «Trapped Plasma» zu berücksichtigen sind.

Ferner bedeuten die mit agglutinierenden Antiseren erhaltenen Befunde, daß durch die Antikörper die Erythrozytenzwischenräume größer sind als durch die Hydrathülle bedingt. Demnach hat man bei der Agglutination keine optimale Annäherung der Erythrozytenoberflächen, was durch eine relativ starre Brückenbildung der Antikörper verursacht sein kann, da selbst die hohen Zentrifugalkräfte es nicht vermögen, das Minimum der Abstände der Zellen zu erreichen.

Es ist seit längerem bekannt, daß die Membranen während der Lagerung einen Abstrom von Lipiden erleiden. In Abb 7 nimmt der Widerstand der gepackten Zellen mit zunehmender Lagerungszeit des Blutes ab was auf eine zunehmende Hydrierung der Membranoberflächen hinweist. Somit müssen während der Kon-

servierungszeit mehr hydrophile Gruppen der Zellen zur Wirkung kommen. Dies könnte durch den Abstrom von Substanzen verursacht sein, deren nach außen weisende Gruppen lipophil sind, jedoch mit hydrophilen Gruppen an den hydrophilen Strukturеiweißen angelagert waren.

Zusammenfassung

Der elektrische Widerstand gepackter Erythrocyten wird durch 2 Komponenten verursacht. Der eine Teilwiderstand ist abhängig von der Leitfähigkeit des Suspensionsmediums und wird auf kapillare Zwischenräume zwischen den Zellen zurückgeführt, die wiederum vom Hydratationsgrad der Erythrocytenoberfläche abhängen. Die andere Komponente stellt einen konstanten Widerstand dar, der sich nur durch Behandlung oder Veränderung der Membran beeinflussen läßt. Daher ist dieser Widerstand als Oberflächenwiderstand der Erythrocyten anzusehen. Es ist somit die Möglichkeit gegeben, durch Messung des Widerstandes gepackter Erythrocyten Aussagen über den möglichen Mindestzwischenraum und die Hydratation der Oberflächen zu machen.

Summary

The electric resistance of agglomerated erythrocytes is caused by 2 components. One part of the resistance depends on the conductibility of the suspension medium and is attributable to the capillary interstices which depend on the hydration degree on the surface of the erythrocytes. The other component is a constant resistance which is only influenced by changes in the membrane. Therefore this resistance can be considered as resistance of the surface of the erythrocytes. So it is possible that in measuring the resistance of agglomerated erythrocytes one can estimate the smallest interstices as well as the hydratation of the surfaces.

Résumé

La résistance électrique d'érythrocytes agglomérés est causée par deux composantes. Une partie de la résistance dépend de la conductibilité du milieu de suspension et est due à des interstices capillaires qui dépendent du degré d'hydratation de la surface des érythrocytes. L'autre composante est une résistance constante qui n'est influencée que par des changements de la membrane. Cette résistance peut donc être considérée comme étant la résistance de la surface des érythrocytes. Ainsi il devient possible en mesurant la résistance d'érythrocytes agglomérés d'évaluer l'interstice le plus petit possible et l'hydratation des surfaces.

Literatur

1. KLEIN, N. Der Chromateinbau in menschliche Erythrocyten. Habilitationsschrift, Freiburg i. Br. 1963.
2. KLEIN, N. The electrical resistance of the red cell column and its relation to the trapped Plasma. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Lissabon 1963 (Karger Basel/New York 1964)
3. RAJEWSKY, B. und SCHWAN, H. Die Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen. Naturwissenschaften 35, 315 (1948).

4. Ponder, E. Hemolysis and Related Phenomena (Grune und Stratton, New York 1948).
5. Ruhenstroth-Bauer, G. Erfahrungen bei der Elektrophorese von Blutzellen. Ergebn. Bluttransf.Forsch., Bibl. haemat., Basel 12: 1 (1961)
6. Morton, J. A. and Pickles, M. M. Use of trypsin in the detection of incomplete anti-Rh antibodies. Nature, Lond. 159: 779 (1947).
7. Wiener, A. S. and Katz, L. Studies on the use of enzymetreated red cells in tests for Rh sensitization. J. Immunol. 66: 51 (1951).
8. Ponder, E. Effects produced by trypsin on certain properties of the human red cell. Blood 6: 350 (1951)
9. Ponder, E. and Ponder, R. V. The electrophoretic velocity of human red cells, their ghosts and mechanically produced fragments and of certain lipid complexes. J. gen. Physiol. 43: 503 (1960)
10. Seaman, G. V. F. und Uhlenbruck, G.: Die elektrophoretische Beweglichkeit von Erythrocyten nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen und Antiseren. Klin. Wschr. 40: 699 (1962)
11. Kleine, N. und Matthes, M. Die Lagerung von [illegible] [illegible]. Ungar. Haemat. Kongr. Pécs 1963, Haemat. hung. 4: 145 (1964).
12. Klenk, E. und Uhlenbruck, G. Über neuraminhaltige Mucoide aus Menschenerythrocytenstroma, ein Beitrag zur Chemie der Agglutinogene. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319: 151 (1960)

Adresse der Autoren: Doz. Dr. N. Kleine und Dr. W. [illegible], Med. Univ.-Klinik, [illegible] 55, *78 Freiburg i. Br.* (Deutschland)

XIth Congress of the International Society of Haematology

The XIth Congress of the International Society of Haematology will be held in Sydney Australia, from August 21st to 26th, 1966.

Scientific programme The scientific sessions will be held t the University of Sydney The morning sessions will consist of tw simultaneous plenary meetings and the after noon sessions will deal with wid range of topics in papers, symposia and round-table discussions. The following topics have been chosen for the plenary sessions The lymphoid cell in health and disease; nutrition and anaemia; leukaemogenesis; genetics red cell metabolism; coagulation red cell production and destruction factors in thrombosis leucocyte and platelet physiology; haemoglobin structure

Language Papers may be given in either English or French. There will be no simultaneous translations t this Congress. This is in accordance with the decision of the meeting of Councillors in Stockholm in 1964 However it is planned to have available for members of the Congress at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given t the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to *the Secretaries-General, XIth Congress of the International Society of Haematology, 1 York St., Sydney N.S.W Australia.*

XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion

The XIth Congress of the I ternational Society of Blood Transfusion will be held in Sydney Australia, from August 24th to 29th, 1966. The Congress will follow imme diately after the XIth Congress of Haematology and joint Plenary Sessions have been arranged for Thursday August 25th, and Friday August 26th, 1966.

Scientific programme. It is planned to hold two plenary sessions each morning The following subjects have been chosen for the plenary sessions, the first four being combined sessions with the Congress of the International Society of Haematology Recent advances in blood genetics; white cell and platelet physiology red cell metabolism; structure of haemoglobin auto-immunity extra-corporeal circulation organ transplantation; plasma proteins. The afternoon sessions will be devoted to papers on selected subjects, e.g. new aspects of blood and serum groups fractionation of blood; plastics in blood transfusion automation in blood banks coagulation disorders immuno-haematology including haemolytic disease of the newborn; preservation of blood.

Languages. Papers may be given in either English or French. It is planned to has available for members of the Congress, at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to *the Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion, 1 York St., Sydney N.S.W Australia.*

Acta haemat. 34 65–71 (1965)

Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Güntherschen Porphyria congenita

Von Ludwig Heilmeyer und Roman Clotten

Die Störung der Porphyrinsynthese bei der Güntherschen Porphyrie liegt nach allgemeiner Meinung in einem Defekt der Isomerase (1). Dieses Ferment bewirkt die Synthese des Uroporphyrins vom Typ III aus Porphobilinogen. Wird die Isomerase etwa durch Erhitzen des Blutes auf 60 bis 65 °C geschädigt, so entsteht im Inkubationsversuch *in vitro* die Isomerenstruktur I des Urophyrins, welche für die Hämsynthese unbrauchbar ist. Derselbe Vorgang spielt sich im Organismus des Kranken mit Günthérscher Porphyrie ab. Das nicht verwertbare Uroporphyrin I und das daraus entstehende Coproporphyrin I werden im Harn und Stuhl ausgeschieden. Durch Einlagerung dieser Porphyrine in der Haut entsteht die Lichtsensibilisierung bei diesen Kranken. Neuerdings ist aber gezeigt worden, daß der Isomerasedefekt nicht alle Erscheinungen der Güntherschen Porphyrie zu erklären vermag (3–6). Es zeigte sich nämlich im Syntheseversuch mit Bluthämolysat von Kranken mit Günthérscher Porphyrie, dass das Blut dieser Kranken weit mehr Porphyrine bildet als normal. Es könnte nun sein, daß die vermehrte Anflutung von Porphyrinvorstufen zu einer relativen Insuffizienz der Isomerase führt, wodurch Porphyrine vom Isomerentyp I neben III gebildet werden, welche dann das Krankheitsbild der Güntherschen Porphyrie verursachen. Um diese Dinge zu klären, haben wir mit dem Bluthämolysat unseres Patienten *Popke* (2) die Uroporphyrinbildung aus Porphobilinogen *in vitro* untersucht und die Ergebnisse mit denen aus gesundem Blut verglichen, nachdem ähnliche Untersuchungen unter Zusatz von δ-Aminolävulinsäure bereits in unserer ersten Arbeit veröffentlicht worden sind (2). Die Ergebnisse sind in den Tabellen I–III und Abb. 2 niedergelegt. Bezüglich der Methodik sei auf unsere Monographie «Störungen der Hämsynthese» hingewiesen (3).

Tabelle I
Normalbluthämolysat
Zusatz von Pbg/100 ml Ery. Inkubationszeit 2 Stunden
pH 7,4. Angegebene Werte in µg/100 ml Ery.-Masse.

	Vorwert	Zusatz von 10µ mol Pbg (2,45 mg)	äquival. µg Pbg.	Zusatz von 100µ mol Pbg. (24,5 mg)	äquival. µg Pbg
δ-ALA	58	43	—	40	—
Pbg	26	277	277	5150	5150
Uro	2	386	412	4160	4425
Copro	3,7	980	1345	7095	9715
Proto	58	99	159	264	423
äquival. Pbg nach Abzug des Vorwertes			2193		19633
Gesamtsyntheseleistung: äquival. µg Pbg			1916		14483
Verlust an Pbg			14,8%		19,8%

Tabelle II
Bluthämolysat (Günthersche Porphyrie)
Zusatz von Pbg/100 ml Ery. Inkubationszeit 2 Stunden
pH 7,4. Angegebene Werte in µg/100 ml Ery.-Masse

	Vorwert	10µ mol Pbg. (2,45 mg): nach Abzug Leerwert	10µ mol Pbg. (2,45 mg): Pbg. äquival.	100 µ mol Pbg. (24,5 mg): nach Abzug Leerwert	100 µ mol Pbg. (24,5 mg): Pbg äquival.
δ-ALA	52	36	—	36	—
Pbg	234	274	274	2048	2048
Uro	709	1472	1566	19030	20248
Copro	529	342	469	817	1121
Proto	210	76	123	239	385
Pbg-äquival. nach Abzug Leerwert			2432		23802
Gesamtsyntheseleistung: äquival. µg Pbg			2158		21734
Verlust an Pbg			18 µg = 0,75		698 µg = 2,85

Wie die Betrachtung der Tabellen I und II zeigt, ist die Leistung der *Porphyrinsynthese* im *Bluthämolysat* der *Günther*schen Porphyrie bedeutend höher als im normalen Bluthämolysat. Besonders bei einer Vorlage von 100 µMol Porphobilinogen tritt der Unterschied deutlich hervor. Das zugesetzte Porphobilinogen ist nach 2 Std. im Porphyrie-Blut fast völlig umgesetzt, während bei normalem Blut in derselben Zeit noch über $^1/_3$ der zugesetzten Menge unverbraucht vorhanden ist. Dieser Befund einer höheren Syntheseleistung des Porphyrieblutes stimmt völlig mit unseren

Tabelle III

	Anteil Isomere I		Anteil Isomere III	
	Vorlage von 10 µMol	100 µMol	Vorlage von 10 µMol	100 µMol
Gesundes Blut	Spuren	0,9%	100%	99 1%
Blut Popko	88%	79%	12%	21%

früheren Befunden nach Zusatz von δ-ALA überein (2) Dasselbe fanden auch WATSON und Mitarb (6) Die Fermentaktivitäten sind im Blut des Patienten Popko gesteigert, sowohl was die Delta ALA Dehydratase (?) wie auch die Porphobilinogen Deaminase betrifft.

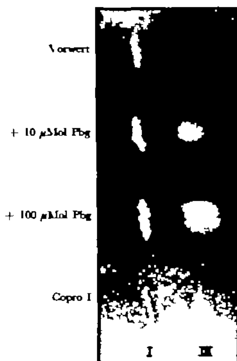
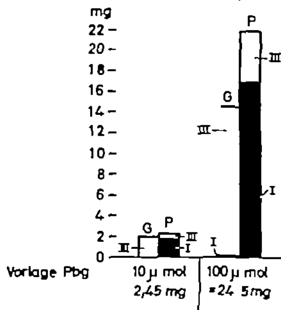


Abb 1

Bestimmt man in dem gebildeten Coproporphyrin die Anteile der Isomeren I und III so ergibt sich, wie Tabelle III zeigt, eindeutig das Versagen des Ferments Isomerase bei dem verschiedenen Substratangebot (10 µMol und 100 µMol Pbg) Bei höherem Angebot wird – wie bei jeder Fermentreaktion eine höhere Umsatzlei



G = Versuch mit gesundem Blut, P = Versuch mit dem Patientenblut, I = Copro I
III = Copro III
Abb. 4

stung erzielt. Während bei 10 μMol nur 12% des normalen Isomerentyps III gebildet werden, werden bei 100 μM Angebot 21% des Isomerentyps III gebildet. Abb 1 zeigt die Originalchromatogramme. In Abb 2 wurde aus den Werten der Tabellen I bis III die gesamte Syntheseleistung auch hinsichtlich der Bildung beider Isomerentypen zur Darstellung gebracht. Auch hier sieht man, wie durch die höhere Leistung der Pgb Deaminase im Blute P eine vermehrte Bildung von Porphyrinen des Typs III resultiert. Die gesteigerte Aktivität der porphyrinbildenden Fermente wirkt also im Sinne eines Kompensationsmechanismus.

Diskussion

Die Frage ist, wie dieser Kompensationsmechanismus zustande kommt. Kann der Defekt der Isomerase und die gesteigerte Aktivität der porphyrinbildenden Fermente im Sinne einer einheitlichen Störung aufgefaßt werden? Unsere jetzigen und früheren Befunde haben ergeben daß sowohl die δ-ALAD wie die Pgb. Deaminase in den Erythrocyten des Kranken mit Güntherscher Porphyrie erhöht sind. Wir kommen zu einem Verständnis dieser Tatsache wenn wir die Vorstellung von JACOB UND MONOD (5) zu Grunde legen wonach mehrere Strukturgene einer Steuerung

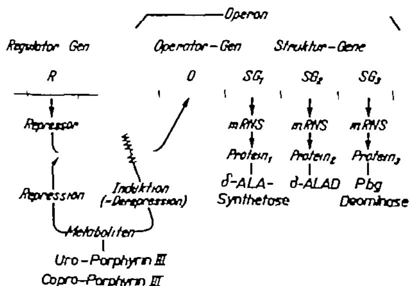


Abb. 3

durch ein Operatorgen unterliegen. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß mehrere Strukturgene zu einem Operon vereinigt sind, welches durch ein Operatorgen gesteuert wird. Das Operatorgen unterliegt der Einwirkung eines Repressors bzw. Induktors über ein Regulatorgan. Durch Metaboliten kann die Wirksamkeit des Repressors gehemmt oder in Gang gesetzt werden. Nehmen wir an, daß Uro- oder Coproporphyrin vom Typ III ein solcher den Repressor beeinflussender Metabolit sei, so würde die normale Bildung von Typ III normalerweise eine Repression des Operatorgens bewirken. Wird aber infolge des Isomerasedefekts die Bildung der Porphyrine vom Typ III vermindert, so wurde die Hemmwirkung des Repressors vermindert und es käme dann zu einer gesteigerten Wirkung der Strukturgene des Operons. In unserem Falle würde dadurch die Synthese der Porphyrinenzyme gesteigert. Tatsächlich wurde von uns eine gesteigerte Aktivität der δ-ALAD und der Pbg-Deaminase nachgewiesen. Wahrscheinlich ist auch das Ferment des 1. Schrittes der Porphyrinsynthese in seiner Aktivität gesteigert, denn nur so kann man die vermehrte Anflutung der Porphyrinvorstufen in vivo bei der Guntherschen Porphyrie verstehen. Wir dürfen also in der Zeichnung anstelle von SG das Gen für die δ-Aminolävulinsäure-Synthetase anstelle von SG_2 das Gen

für die δ-ALAD und anstelle von SG_3 das Gen für die Pbg Deaminase einsetzen. Es ist nach diesen Vorstellungen wahrscheinlich, daß diese drei Fermente (und vielleicht auch noch die folgenden der Kette) zu einem gemeinsamen Operon gehören. Man sieht, daß nach dieser Theorie der Isomerasedefekt zu einer gesteigerten Synthese der Porphyrine führen muß. Natürlich könnte auch das Uroporphyrin I als Induktor wirken. Mit diesen Vorstellungen sind die verschiedenen bei der Güntherschen Porphyrie beobachteten Erscheinungen auf eine einzige Ursache zurückgeführt, was sehr befriedigend ist.

Zusammenfassung

Syntheseversuche mit Bluthämolysaten von Gesunden und dem eines Kranken mit Güntherscher Porphyrie zeigen, daß bei dieser Krankheit neben dem Defekt der Isomerase eine gesteigerte Leistung der Porphobilinogen-Desaminase vorliegt. Diese – zusammen mit der früher nachgewiesenen Steigerung der δ-Aminolävulinsäure Dehydratase – ist im Sinne eines Kompensationsmechanismus wirksam, welcher trotz des vorhandenen Defekts der Isomerase zu einer mehr oder weniger genügenden Synthese des Isomerentyps III und damit der Hämoglobinsynthese führt. Die Ursache dieser gesteigerten Fermentfunktionen wird anhand der von Jacob und Monod entwickelten Vorstellungen über die gemeinsame Steuerung mehrerer Strukturgene diskutiert.

Summary

Investigation of the synthesis of blood haemolysate in healthy subjects and patient with Gunther's porphyria shows that in this disease there is not only isomerase deficiency but also increased production of porphobilinogen deaminase. Together with the previously demonstrated increase in δ-aminolevulinic acid dehydratase this acts as a compensation mechanism which, despite the lack of isomerase, leads to a more or less adequate synthesis of type III isomer and therefore also of haemoglobin. The cause of this increased enzyme function is discussed in relation to the theory of the control of several linked structural genes propounded by Jacob and Monod.

Résumé

Des essais de synthèse à l'aide de sang hémolysé de personnes saines et de malades souffrant de porphyrie de Günther démontrent qu'il existe à côté d'un manque d'isomérase une activité accrue de la désaminase de porphobilinogène. Celle-ci agit avec l'augmentation de la déhydratase de l'acide δ-aminolévulique démontrée antérieurement en tant que mécanisme compensatoire qui permet malgré le manque d'isomérase une synthèse plus ou moins suffisante de l'isomère du type III et par là de l'hémoglobine. La cause de l'augmentation de ces activités est discutée à l'aide des conceptions développées par Jacob et Monod sur le réglage en commun de plusieurs gènes de structure.

Literatur

1. Goldberg, A. and Rimington, C. Diseases of porphyrin-metabolism (Thomas, Springfield 1962).
2. Heilmeyer, L.; Clotten, R. Kerp L. Merker, H. Parra, Ch. A. und Wetzel, H. P. Porphyria erythropoetica congenita Günther. Dtsch. med. Wschr. 2449 (1963)
3. Heilmeyer, L. Clotten, R. und Heilmeyer, L. Die Störungen der Bluthämsynthese (Thieme 1964)
4. Holzer, H. Intracelluläre Regulation des Stoffwechsels. Naturwissenschaften 1963, 260
5. Jacob, F and Monod J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. J molec. Biol. 3, 318 (1961)
6. Watson, C. J. Runge, W. Taddeini, L. Bossenmaier, J und Cardinal, R. Ein vermuteter Control-Gen-Mechanismus für die excessive Produktion von Typ I und Typ III – Porphyrinen bei kongenitaler erythropoetischer Porphyrie. Proc. Acad. Sci. 52, 478 (1964)

Adresse der Autoren: Prof. Dr. L. Heilmeyer und Doz. Dr. R. Clotten, Med. Univ.-Klinik, Hugstetterstr. 55, 78 Freiburg i. Br. (Deutschland)

Acta haemat. 31 72–87 (1963)

Medical Clinic of the University of Perugia (Italy)
(Director: Prof. Paolo Larizza)

Studies on the Tetrahydrofolic Acid Dependent Enzyme System in Human Leukocytes*

By F. Grignani, M. Martelli, M. Tonato and A. Colonna

In the last few years the enzyme system dependent on folic coenzymes has been investigated in bacteria and animal tissues. Recently studies on the behavior of some of these enzymes in human normal and leukaemic leukocytes were carried out** (2–4, 8–9, 18–22).

In both normal and leukaemic cells the following enzymes have been detected: *1.* N_{10} Formylsynthetase (2, 3, 4, 18, 8); *2.* Methylene THFA dehydrogenase (2, 18, 8); 3. Serine hydroxymethylase (2); 4. Cyclohydrolase (9). N_{10} Formyl THFA deacylase (3) was also studied and proved to be unmeasurable in circulating blood cells. 5-Formyl isomerase (18) is present in minimal amounts.

All these enzymes belong to the C_1-fragment transporting system and are connected with the C_1 sources and mutually linked according to the scheme of fig. 1. More detailed researches have been accomplished on the following enzymes: methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase; quantitatively the results achieved by Bertino et al. (2), Wilmanns (18) and Grignani et al. (8) were roughly similar. As a rule the enzymatic activity depending on THFA is higher in the blastic cells of acute leukaemia than in mature granulocytes of normal subjects.

In acute and chronic myelocytic leukaemia Grignani et al. (8) and Wilmanns (18) observed a progressive fall of the enzymatic ac-

* Studies supported by a grant of 'Consiglio Nazionale delle Ricerche'.

** The following abbreviations have been used: AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside; ATP: Adenosine-5-triphosphate; dUMP: Deoxyuridine-5-monophosphate; GAR: Glycinamide riboside; 6MP: 6-mercapto-purine; NADP: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate; TCA: Trichloracetic acid; THFA: Tetrahydrofolic acid; TRIS: Tris-hydroxymethyl-aminomethane; AL: Acute leukaemia; CLL: Chronic lymphocytic leukaemia; CML: Chronic myelocytic leukaemia.

THFA + N FORMYLGLUTAMATE → N_5 FORMYL THFA

THFA FORMATE → N_{10} FORMYL - THFA → 5 FORMAMIDO 4 IMIDAZOLECARBOXAMIDE RIBOTIDE

AICAR

H_2O cyclohydrolase

THFA FORMIMINO GROUPS → N_5 - FORMIMINO THFA → N_5 N_{10} METHENYL THFA → FORMYL GLYCINAMIDE RIBOTIDE

THFA

GAR

NADP

THFA dehydrogenase

THFA SERINE ⇄ N_5 N_{10} METHYLENE THFA → THYMIDILIC ACID

THFA FORMALDEHYDE → N_5 N_{10} METHYLENE THFA

d UMP

Methylene THFA reductase

tivity of methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase parallel with the improvement of the haematologic conditions and namely with the disappearance of nucleolated cells. So far no systematic researches on other diseases have been carried out. BERTINO *et al* (4) suggested that in infectious mononucleosis the N_{10}-formyl THFA synthetase activity is markedly high. WILMANNS (21) observed that the immature cells of normal marrow contain formyl-THFA synthetase and N_5, N_{10} methylene THFA dehydrogenase in higher concentrations than normal circulating cells.

N_{10}-formyl THFA synthetase has been partially purified from erythrocytes (3) In red blood cells was also demonstrated the presence of serine hydroxymethylase and methylene THFA dehydrogenase (3 18, 8) The enzymatic activity is markedly higher in reticulocytes than in mature red blood cells. Chicken nucleated erythrocytes were characterized by a N_{10} formyl THFA synthetase and N_5, N_{10}-methylene THFA dehydrogenase content higher than in mature human erythrocytes (8)

The research so far carried out on the behavior of THFA dependent enzymes is partial and fragmentary In our present investigations we aimed at studying the behavior of most of the enzymes shown in fig 1 in normal and leukaemic leukocytes. The activity of these enzymes was examined following the course of the disease, and compared to that of normal human liver obtained by surgical biopsy

Methods

) Clinical Material

Our investigations were performed on normal erythrocytes and isolated leukocytes of peripheral blood of normal and leukaemic subjects. I the latter repeated assay were made t differen intervals, in relation to the progress of the disease and to the antiblastic therapy Studies on the activity of enzymes connected with THFA in liver tissue of some normal subjects and in malignant limphomas were also carried out.

b) Leukocyte Isolation and Lysate Preparation

Leukocyte isolation was performed following modification of method described elsewhere (9) 5 ethylene-diaminotetraacetic acid, Mg salt, was used as anticoagulant, in the proportion of 1 ml per 9 ml of blood.

Sedimentation of the collected blood was allowed to proceed i siliconized glass for about 60 minutes. The supernatant plasma, containing most leukocytes, was centrifuged at 120 p. m. for 10 minutes. Leukocytes precipitate was again suspended in isotonic sodium chloride solution The cellular suspension, after leukocyte counting as centrifuged at 120 p m for 10 min. The limpid supernatant fluid was removed and precipitate again suspended in a amount of mM K phosphate buffer pH 7 equal to tha of the aspirated supernatant fraction. The cytolysate was then homogenized in

teflon-glass Potter homogenizer for 10 minutes. After 15 minutes, the lysate was centrifuged for 20 minutes at 10,000 r. p. m. in refrigerated centrifuge and the supernatant fluid utilized for enzymatic assays. All the operations concerning leukocyte isolation and lysate preparation were conducted at 4° C.

c) Preparation of Lymphatic Glands and Liver Homogenate

These fragments obtained with surgical biopsy were homogenized in teflon-glass Potter homogenizer for 15 minutes with mM K phosphate buffer pH 7. After 15 minutes at 4° C, the homogenate was centrifuged at 10,000 r. p. m. for 15 minutes and the supernatant fluid was then utilized for enzymatic determinations.

d) Reagents

dl L-tetrahydrofolic acid, formiminoglutamic acid, barium salt, L-serine and glutamic acid were provided by the Sigma Chem. Company. Calcium salt of 5-formyl-THFA was supplied by the Lederle Laboratories. dl N_5, N_{10}-methenyl-THFA was prepared following Tabor and Wyngarden technique (16).

e) Enzyme Assays

Our researches were aimed to the following enzymes depending on THFA: 1. N_{10}-formyl synthetase. 2. N_5, N_{10}-methylene THFA dehydrogenase. 3. serine hydroxymethylase. 4. cyclohydrolase. 5. N_5-formyl isomerase. 6. formimino THFA transferase. 7. N_5-formyl THFA transformylase.

1. N_{10}-formyl THFA synthetase (or formate activating enzyme, or formylase) was assayed following a modification of the WHITELEY (18) technique. The 10-formyl-THFA formed in the enzymatic reaction is converted to 5-, 10-methenyl THFA in acid medium.

Assay composition	TRIS buffer pH 7.4	100 μMol
	2 mercapto-ethanol	20 μMol
	Na formate	100 μMol
	$MgCl_2$	40 μMol
	NH_4Cl	20 μMol
	THFA	2.7 μMol
	ATP	10 μMol
	lysate equal to 1 · 10 cells	
	H_2O to volume of 2 ml	

The assay mixture was incubated in water bath at 37° C for 20 minutes under petroleum ether. At 0 min and 20 min 0.5 ml of the mixture were deproteinized and acidified with 0.25 ml of 5 M $HClO_4$. After 15 min at room temperature the denaturated proteins were removed by centrifugation and the supernatant fluid brought to 2 ml with H_2O.

2. N_5, N_{10}-methylene THFA dehydrogenase. The method utilized was a modification of the technique followed by WILMANNS (18), BERTINO et al. (2) and GIOVANNETTI et al. (8). It is based on the enzymatic formation of N_5, N_{10}-methenyl THFA stabilized through acidification.

Assay composition	K phosphate buffer pH 7.4	200 μMol
	2 mercapto-ethanol	20 μMol
	HCHO	10 μMol
	THFA	2.7 μMol

tivity of methylene THFA dehydrogenase and formyl THFA synthetase parallel with the improvement of the haematologic conditions and namely with the disappearance of nucleolated cells. So far no systematic researches on other diseases have been carried out. BERTINO *et al.* (4) suggested that in infectious mononucleosis the N_{10} formyl THFA synthetase activity is markedly high. WILLMANNS (21) observed that the immature cells of normal marrow contain formyl THFA synthetase and N_5 N_{10} methylene THFA dehydrogenase in higher concentrations than normal circulating cells.

N_{10} formyl THFA synthetase has been partially purified from erythrocytes (3). In red blood cells was also demonstrated the presence of serine hydroxymethylase and methylene THFA dehydrogenase (3, 18, 8). The enzymatic activity is markedly higher in reticulocytes than in mature red blood cells. Chicken nucleated erythrocytes were characterized by a N_{10}-formyl THFA synthetase and N_5 N_{10} methylene THFA dehydrogenase content higher than in mature human erythrocytes (8).

The research so far carried out on the behavior of THFA dependent enzymes is partial and fragmentary. In our present investigations we aimed at studying the behavior of most of the enzymes shown in fig. 1 in normal and leukaemic leukocytes. The activity of these enzymes was examined following the course of the disease and compared to that of normal human liver obtained by surgical biopsy.

Methods

a) Clinical Material

Our investigations were performed on normal erythrocytes and isolated leukocytes of peripheral blood of normal and leukaemic subjects. In the latter, repeated assays were made at different intervals, in relation to the progress of the disease and to the antiblastic therapy. Studies on the activity of enzymes connected with THFA in liver tissue of some normal subjects and in malignant limphomas were also carried out.

b) Leukocyte Isolation and Lysate Preparation

Leukocyte isolation was performed following a modification of the method described elsewhere (9). 5% ethylene-diaminotetraacetic acid, Mg salt, was used as anticoagulant, in the proportion of 1 ml per 9 ml of blood.

Sedimentation of the collected blood was allowed to proceed in siliconized glass for about 60 minutes. The supernatant plasma, containing most leukocytes, was centrifuged at 120 r. p. m. for 10 minutes. Leukocytes precipitate was again suspended in isotonic sodium chloride solution. The cellular suspension, after leukocyte counting, was centrifuged at 120 r. p. m. for 10 min. The limpid supernatant fluid was removed and precipitate again suspended in an amount of mM K phosphate buffer pH 7 equal to that of the separated supernatant fraction. The cytolysate was then homogenized in a

7. N_5-formyl THFA transferase. The enzyme was assayed according to SILVERMAN' method (15). The tetrahydrofolate obtained from the N_5-formyl THFA was quantitatively converted into p-aminobenzoyl-glutamic acid and was assayed following BRATTON AND MARSHALL (5) method for arylamine.

Assay composition K phosphate buffer pH 6.0 330 µMol K gl tamate pH 6.0 34 µMol N_5-formyl-THFA 0.26 µMol lysate containing up to 1×10^8 cells H_2O to final volume of 3.5 ml.

After an incubation at 37° C for an hour the reaction was stopped by adding 1.5 ml of 10% TCA. Denaturated protein was then precipitated by centrifugation and BRATTON AND MARSHALL reagents added to the supernatant fluid. The arylamine produced corresponds stechiometrically to the THFA formed in the incubation mixture. Two controls without N_5-formyl THFA and enzyme were carried out for every assay.

Hexokinase was assayed according to GRIGNANI AND LOHR (7), lactic dehydrogenase according to BEISENHERZ et al. (1), glucose-6-P dehydrogenase according to KORNBERG AND HORECKER (11), succinic dehydrogenase according to KUBOWITZ AND LUTTGENS (12).

All the determinations were performed by means of Beckman DU spectrophotometer in cuvettes of 1 cm light path. Only succinic dehydrogenase was assayed in Warburg-respirometer. One unit is defined as the amount of enzyme which causes in 1 minute the disappearance of 1 µMol of substrate or the formation of similar amount of reaction product. Specific activity is defined as units per mg of protein and/or per 10 cells.

In reactions catalyzed by N_{10}-formyl synthetase, methenyl THFA dehydrogenase, formimino-THFA transferase and cyclohydrolase for the calculation it was utilized the molar extinction coefficient of N_5, N_{10}-methenyl THFA (24.9×10^3 at neutr pH and at 355 nm for cyclohydrolase; 24.9×10^3 at acid pH and at 350 nm for the other enzymes (13).

For the N_5-formyl isomerase the unit was arbitrarily defined as the quantity of enzyme which causes a Δ extinction of 0.001 in one minute at 295 nm.

Protein was determined following WARBURG AND CHRISTIAN' method (17) based on the different coefficient of extinction of protein at 260 and 280 nm.

Table I

Levels of THFA-dependent enzymes and of hexokinase, lactic dehydrogenase glucose 6-P dehydrogenase and succinic dehydrogenase in normal human leukocytes (µMol min⁻¹/10¹⁰ cells)

Enzymes	No. of subjects	mean values ± s.e.
Formyl THFA synthetase	10	1.46 ± 0.40
Methylene THFA dehydrogenase	10	0.905 ± 0.13
Serine hydroxymethylase	10	1.084 ± 0.19
Cyclohydrolase	20	1.85 ± 0.158
Formimino-THFA transferase	10	0.00
Formyl THFA transferase	10	0.00
Formyl THFA isomerase	10	0.00
Hexokinase	10	11.2 ± 1.2
Lactic dehydrogenase	10	300.0 ± 45.0
Glucose-6-P dehydrogenase	10	109.0 ± 11.1
Succinic dehydrogenase	10	4.07 ± 0.9

Table II

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of chronic myelocytic leukaemia (μMol × min^{-1}/10^{10} cells).

Subjects		Formyl-THFA synthetase	Methylene-THFA dehydrogenase	Serine hydroxymethylase	Cyclohydrolase	Formimino-THFA transferase Formyl-THFA transferase Formyl-THFA isomerase
B. M.	1	4.07	2.74	2.68	2.84	
	2	4.60	2.75	3.36	6.70	
	3	5.14	2.39	3.00	4.30	
	4	5.67	1.86	2.71	4.80	
	5	2.72	1.86	2.57	4.10	
C. A.	1	3.36	2.04	3.40	4.40	
	2	3.54	1.15	2.48	2.80	
B. L.	1	2.21	1.06	1.68	2.31	
	2	2.83	1.59	2.12	2.20	
	3	2.45	1.33	1.68	3.70	no activity
F. S.	1	1.51	0.89	1.42	2.20	
	2	0.67	1.15	1.79	4.10	
B. C.	1	0.78	1.10	1.28	2.96	
	2	0.61	0.47	0.53	1.50	
	3	1.95	1.06	1.24	2.40	
T. A.		2.09	1.10	0.93	3.40	
S. G.		0.70	0.57	0.57	1.40	

Results

The activity of the THFA dependent enzymes observed in normal leukocytes is summarized in table I The methods we applied made it possible to demonstrate only the activity of 4 out of 7 enzymes investigated Formyl THFA isomerase formyl THFA transferase and formimino-THFA transferase must be regarded as absent in normal leukocytes or present in such a low concentration requiring more sensitive techniques and or preliminary purification processes. Conversely formyl THFA synthetase methylene THFA dehydrogenase cyclohydrolase and serine hydroxymethylase were present in measurable amount, of about the same magnitude

The enzymatic content proved to be highly variable according to the case attempts to correlate the activity of enzymes dependent from THFA with some parameters such as the leukocytes number the leukocyte differential count and the sedimentation rate of erythrocytes failed

In the single cases, the cyclohydrolase showed a slightly higher activity followed by the formyl THFA synthetase serine hydro-

Table III

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of acute leukaemia (μMol × min⁻¹/10¹⁰ cells)

Subjects		10 Formyl-THFA synthetase	Methylene THFA dehydrogenase	Serine hydroxy methylase	Cyclo-hydrolase	Formimino-THFA transferase Formyl-THFA transferase Formyl-THFA isomerase
S. D	1	1 77	1 67	2.30	3.33	
	2	1.95	1.50	2.12	4.60	
	3	3.46	2.36	3.18	4 10	
	4	3.72	2.39	3 90	8.50	
	5	6.28	3.36	4.86	10.10	
C. E.	1	4 47	2.70	3.00	7.30	
	2	4.57	2.62	3.00	8 20	
	3	3.28	1.86	2.1	4.98	
	4	3.28	2.21	2.70	3.30	
P V	1	5 05	2.57	3.72	4 60	
	2	6.55	2.48	3.28	3.40	no activity
	3	4 82	2.63	4 10	4 10	
T G.	1	2.58	1 77	2.29	3.30	
	2	6.66	2.40	2.90	7.50	
	3	5.30	1.91	1.63	3 50	
	4	8.80	3.10	2.07	6.90	
L. A.	1	4 40	2.10	1 70		
F D	1	1 70	1.60	1 70		
B. C.	1	2.14	0.88	1.30	2.6	
	2	3	0.93	1.2	2.7	
	3	3.2	1 10	1.04	3.50	
	4	3.3	1.38	1.29	2.8	

lymphoblastic leukaemia.

xymethylase and finally by methylene THFA dehydrogenase. Some glycolysis enzymes (hexokinase and lactic-dehydrogenase) and of the pentose shunt (glucose-6-P dehydrogenase) showed an activity of 3 to 100 times higher The activity of an enzyme of the Krebs cycle instead (succinic dehydrogenase) was not very different from that of THFA-dependent enzymes.

The enzymatic activity observed in chronic myeloid leukaemia is summarized in table II and the most significant cases are outlined in fig 2 and 3 In table III there are summarized the values obtained in acute leukaemia, some instances are shown in fig 4 and 5

The mean values of activity were not calculated since the heterogeneity of cellular population, namely in chronic myeloid leukaemia, makes every case quite different from the other Moreover in the same case different values were observed after subsequent determinations, in relation to various factors which will be later examined. In leukaemic cells also the highest enzymatic activity was

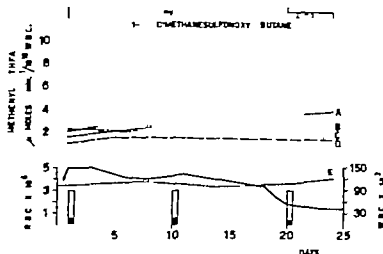


Fig. 2. Level of THFA-dependent enzymes in a case of chronic myelocytic leukaemia. A. Cyclohydrolase. B. N_{10}-formyl-THFA synthetase. C. Serine hydroxymethylase. D. N_5, N_{10}-methylene THFA dehydrogenase. E. Red blood cells. F. White blood cells. Black bars indicate the percentage of blast cells.

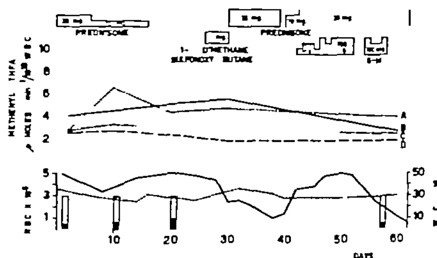


Fig. 3. Level of THFA-dependent enzymes in a case of chronic myelocytic leukaemia. Legend see fig. 2.

found in cyclohydrolase. Only in a few instances of chronic myeloid leukaemia N_{10} formyl THFA synthetase activity was predominant. It was also found that the activity of serine hydroxymethylase was slightly higher than that of methylene THFA dehydrogenase. According to the methods used this would appear theoretically im-

possible. Probably the substrate given to the methenyl THFA dehydrogenase by the serine hydroxymethylase was such easier to metabolize than the one obtained chemically from the synthesis of THFA and formaldehyde. Controls executed with the direct method of determination of serine hydroxymethylase gave anyway overlapping results.

The enzymatic content of the heterogenous cellular population in chronic myeloid leukaemia was very often higher than in normal granulocytes (table I and II). The finding was even more evident in the acute phases of chronic myeloid leukaemia and namely in blast cell leukaemia (table III).

Fig. 2 to 5 indicate that in both chronic myeloid and acute leukaemia during the course of the disease significant changes of the enzymatic activity occurred. The modification observed were roughly the same for all four enzymes.

From fig. 2 to 5 there is no connection between the level of enzymatic activity and the number of circulating leukocytes. Conversely it appears evident that the enzymatic content is correlated in inverse proportion to the degree of maturity of the cell. The highest enzymatic activity was therefore found (fig. 5) in those acute cases of leukaemia richer in blastic cells. Parallel with the relapse of the haematologic conditions of the patient, which brought to a peripheral blood picture made exclusively of blastic cells, it was ob-

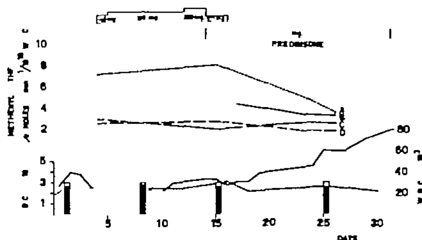


Fig. 4. Level of THFA-dependent enzymes in case of acute leukaemia. Legend see fig. 2.

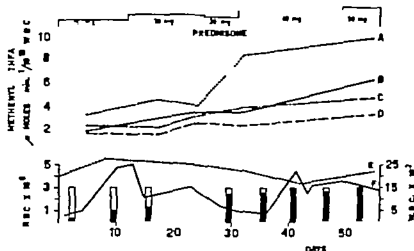


Fig. 5. Level of THFA-dependent enzymes in case of acute leukaemia. Legend see fig. 2

served a progressive increase in the activity of the four enzymes (fig. 5). A lack of parallelism between change in time of the percent of blastic cells and the enzymatic activity was evidenced in the case reported in fig. 4. In this subject the progressive aggravation of the clinical and haematologic situation was accompanied by an evident decrease in the enzymatic activity. It is however likely that this should be correlated with cytostatic therapy. The decrease of the enzymatic activity in fact started after 17 days of treatment with 6-MP and continued under repeated controls even after the discontinuance of the drug. The corticosteroids never proved to affect the enzymatic content. In case outlined in fig. 5 the enzymatic activity increased under steroid therapy in relation to the increased number of immature cells. Alkylating agents, such as triethylenthiophosphoramide and the dimethansulfonoxybutane acted even indirectly inducing an improvement of the blood picture.

In table IV is summarized the enzymatic activity of lymphocytes (peripheral blood of chronic lymphocytic leukaemia) and of the plasma cells (sternal marrow of multiple myeloma). In these cells was demonstrated the presence of the same enzymes evidenced in normal granulocytes and in the cells of other varieties of leukaemia. The enzymatic activity of lymphocytes proved to be rather poor in relation to the modest cytoplasmatic volume of these cells. Plasma cells instead contained a high quantity of formyl THFA synthetase and methylene THFA dehydrogenase whereas the activity of serine

Table IV

Levels of THFA-dependent enzymes in leukocytes of chronic lymphocytic leukaemia an in plasma cells (from marrow) (μMol $\times$ min^{-1}/10^{10} cells)

Enzymes	Chronic lymphocytic leukaemia (mean values)	Plasma cells (from marrow)
Formyl THFA synthetase	1 19±0.205	2.7
Methylene THFA dehydrogenase	0.44±0.028	0.81
Serine hydroxymethylase	1.24	1.04
Cyclohydrolase	1.22	1 10
Formimino THFA transferase		
Formyl THFA transferase	no activity	
Formyl THFA isomerase		

hydroxymethylase and cyclohydrolase was similar to that of norma granulocytes.

In normal human erythrocytes the presence of formyl THF synthetase and methylene THFA dehydrogenase was demonstra ted. The mean values referred to 10^{10} cells were 10 times lower tha those of normal white cells. Conversely there were only traces o serine hydroxymethylase. The determination of cyclohydrolase di not provide reliable results owing to the considerable absorption o hemoglobin at 355 nm. In nucleated erythrocytes of chicken formyl THFA synthetase was found in a concentration only slightly lowe than that observed in normal human red blood cells. Methylene THFA dehydrogenase showed instead an activity only slighth higher

Table V

Levels of THFA-dependent enzymes in human erythrocytes, in reticulocytes and i chicken erythrocytes (μMol $\times$ min^{-1}/10^{10} cells).

	Formyl-THFA synthetase	N_5, N_{10}-methylene-THFA dehydrogenase
Human erythrocytes	89 4±10.4	41±5.06
Human reticulocytes	400	110
Chicken erythrocytes	270	58

In the lysate of an erythrocytic human preparation containin 60 / of reticulocytes the enzymatic activity was more elevated tha that of nucleated chicken erythrocytes (table V)

The enzymes depending on THFA were examined even in hu man liver tissue and in lymph nodes of some subjects suffering fro malignant lymphomas (table VI)

Table VI

Levels of THFA-dependent enzymes in human normal liver and in malignant lymphomas. Mean values (moles × min^{-1}/mg protein).

Enzymes	Human liver	Malignant lymphomas
Formyl THFA synthetase	23.7	6.8
N_5, N_{10}-methylene THFA dehydrogenase	22.0	3.9
Serine hydroxymethylase	31.2	4.9
Cyclohydrolase	26.5	8.5
Formimino THFA transferase	22.5	0.0
5 Formyl THFA isomerase	4.2	0.0

Units as defined under "Methods"

In normal human liver all the enzymes were present with a markedly high and almost overlapping activity. In lymphatic tissue instead we found only the enzymes present in leukocytes. Among them the activity of 10-formyl THFA synthetase proved to be markedly higher.

Conclusions

Our investigations constitute the first approach to the systematic study of enzymes depending on THFA in normal and leukaemic leukocytes. Whereas in normal human liver all the folic enzymes so far known were easily demonstrated and assayed, in leukocytes only some of them are found in detectable quantities, suitable for the methods applied. Though it is impossible to state with certainty that nonmeasurable enzymes are absent from white cells, it is likely that they are present in markedly low amounts.

Since the most active enzymes were cyclohydrolase, formyl-THFA *synthetase, methylene THFA dehydrogenase and serine* hydroxymethylase, the most effective sources of C_1 radicals for the THFA pool in leukocytes are the formate (and therefore some purines and glycine), formaldehyde and serine. On the contrary it could be assumed that the formiminic groups resulting from histidine and the purines have a poor utilization in leukocytes. The behavior of formyl THFA transferase, N_5-formyl THFA isomerase indicates that the utilization of the formylic group of formyl-glutamate is not significant in normal and leukaemic white cells. WILMANNS (18) however succeeded in evidencing a modest amount of formyl isomerase in leukocytes. Such reaction is worth further investigations since it involves folinic acid, the only stable compound of THFA which could be used for the treatment of some forms of megaloblas-

tic anemia and as an antidote in amethopterine poisoning The *active enzymes of leukocytes allow for the formation of 3 compounds* acting as donors of C_1 fragments for important synthesis reactions, namely 10-formyl THFA, N_5, N_{10}-methenyl THFA and N_5, N_{10} methylene THFA (fig 1)

These substances permit the synthesis respectively of formiminodocarboxylamideribotide, formylglycinamide ribotide and of the methylic group of methionine. Further investigation should clarify the behavior of these three reactions in human leukocytes.

Formyl THFA synthetase, methylene THFA dehydrogenase, cyclohydrolase and serine hydroxymethylase show an activity of the same magnitude in leukocytes. The enzymatic activity is higher in blastic cells of leukaemia. Such finding is in accordance with what was reported, only as regards some of the enzymes we have examined, by BERTINO et al. (2) WILMANNS (18–22) and GRIGNANI et al. (8)

Some findings of WILMANNS (21) and BERTINO et al. (2) suggest that the enzymatic hyperactivity should not be correlated with the malignancy of leukaemic cells but only with their greater immaturity Indeed the preparation obtained from marrow blood of normal subjects showed an enzymatic content higher than that of cells obtained from peripheral blood. On the other hand, we have observed that the enzymatic activity of reticulocytes is higher than that of mature erythrocytes.

The influence of therapies on THFA enzymes is as a rule indirect. The enzymatic cellular content decreases owing to the progressive replacement of immature cell population with a more mature one. However in the case of 6-Mercapto purine, it was demonstrated a direct inhibition of formyl THFA synthetase and methylene THFA dehydrogenase (19 20) Moreover in one of our patients the enzymatic *fall occurred immediately after treatment with 6-MP* The study of the influence of antiblastic agents on the activity of THFA dependent enzymes is of outstanding practical importance. It could be possible in fact the working out an in vitro sensibility assay in order to institute an effective therapy

Summary

In normal and leukaemic leukocytes, of the 7 tetrahydrofolic acid (THFA) enzymes examined only four were evidenced formyl-THFA synthetase, methylene-THFA dehydrogenase, serine hydroxymethylase and cyclohydrolase. The activity of these enzymes

is of the same magnitude in normal cells. In blastic cells of both chronic myeloid and acute leukaemia the enzymatic content is higher than that of mature cells. In leukaemic subjects it decreases therefore with the improvement of the peripheral blood picture. In the lymph nodes of some subjects suffering from malignant lymphomas the same enzymes are found as in leukocytes. In human liver tissue instead all the THFA dependent enzymes were evidenced.

Résumé

Nous n'avons pu démontrer que 4 des 7 enzymes de l'acide tétrahydrofolique (ATHF) dans des leucocytes normaux et leucémiques: la synthétase d'ATHF formylé, la déhydrogénase d'ATHF méthylé, la sérine-hydrométhylase et la cyclohydrolase. Ces enzymes ont la même activité dans les cellules normales. Dans les cellules immatures des leucémies chroniques et aiguës, le contenu d'enzymes est plus grand que dans les cellules matures. Il diminue avec l'amélioration de la formule sanguine. Dans les ganglions lymphatiques de quelques malades ayant des lymphadénopathies malignes se trouvèrent les mêmes enzymes que dans les leucocytes. Dans le tissue hépatique de l'homme, tous les enzymes dépendant de l'ATFH ont pu être mis en évidence.

Zusammenfassung

In normalen und leukämischen Leukozyten konnten nur 4 der 7 Enzyme der Tetrahydrofolsäure (THFA) nachgewiesen werden: Formyl THFA-Synthetase, Methylen THFA-Dehydrogenase, Serin-Hydroxymethylase und Cyclohydrolase. In normalen Zellen weisen diese Enzyme dieselbe Aktivität auf. In Blasten chronischer und akuter Leukämien ist der Enzymgehalt höher als in reifen Zellen. Er nimmt bei Besserung des peripheren hämatologischen Befundes ab. In Lymphknoten von Patienten mit malignen Lymphomen finden sich dieselben Enzyme wie in den Leukozyten. In menschlichem Lebergewebe konnten alle THFA-abhängigen Enzyme nachgewiesen werden.

References

1. Beisenherz, G.; Boltze, H. J.; Bücher, T.; Czok, R.; Garbade, K. H.; Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G.: Diphosphofructose-aldolase, Phosphoglycerynaldehyde-dehydrogenase, Milchsäure-dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat Kinase aus Kaninchen-Muskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).
2. Bertino, J. R.; Silber, R.; Freeman, M.; Alenty, A.; Albrecht, M.; Gabrio, B. W. and Huennekens, F. M.: Studies on normal and leukaemic leukocytes. IV. Tetrahydrofolate-dependent enzyme systems and dihydrofolic reductase. J. Clin. Invest. 42, 1899 (1963).
3. Bertino, J. R.; Simmons, B. and Donohue, D. M.: Purification and properties of the formate activating enzyme from erythrocytes. J. biol. Chem. 237, 1314 (1962).
4. Bertino, J. R.; Simmons, B. M. and Donohue, D. M.: Increased activity of some folic acid enzyme systems in infectious mononucleosis. Blood 19, 587 (1962).
5. Bratton, A. C. and Marshall, E. K., Jr.: quoted by: Flaks, J. G. and Lukens, L. N.: The enzymes of purine nucleotide synthesis de novo. B. Assay for diazotizable amines: in Colowick and Kaplan' Methods in Enzymology Vol. VI, p. 55 (Academic Press, New York 1963). J. biol. Chem. 128, 537 1939.
6. Grignani, F.; Colonna, A.; Mastrodicasa, Marisa; Martelli, M.: La glicolisi nei leucociti normali e leucemici. Haematologica 48, 509 (1963).

7 Grignani, F. und Löhr, G. W. Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin. Wschr. *38*, 796 (1960).
8. Grignani, F. Martelli, M. Colonna, A. Alcune osservazioni sul comportamento degli enzimi del pool del tetraidrofolato nelle cellule ematiche. Haematologica *48* 613 (1963)
9. Grignani, F.; Martelli, M. Colonna, A. and Tonato, M. Studies on the properties of cyclohydrolase from human leukocytes. Enzymol. Biol. Clin. *4* 231 (1964)
10. Kay, L. D. Osborn, M. J.; Hatefi, Y. and Huennekens, F. M. The enzymatic conversion of N_5-formyl-tetrahydrofolic acid (folinic acid) to N_{10}-formyl tetrahydrofolic acid. J. biol. Chem. *235*, 195 (1960)
11 Kornberg, B. and Horecker, B. L. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase; in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. I, p. 323 (Academic Press, New York 1955).
12. Kubowitz, F. und Lüttgens, W. Zusammensetzung, Spaltung und Reinigung der Carboxylase. Biochem. Z. *307* 170 (1941)
13. Rabinowitz, J. C. and Pricer, W. E., Jr. quoted by: Tabor and Wyngarden. J. amer. chem. Soc. *78*, 5705 (1956)
14. Scrimgeour, K. G. and Huennekens, F. M. Serine hydroxymethylase in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. V p. 838 (Academic Press, New York 1962)
15. Silverman, M. N_5-formyl-tetrahydrofolic acid-glutamic acid transformylase from hog liver in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. V p. 790 (Academic Press, New York 1962)
16. Tabor, H. and Wyngarden, L. The enzymatic formation of formiminotetrahydrofolic acid, 5-10-methenyl-tetrahydrofolic acid and formyl-tetrahydrofolic acid in the metabolism of formiminoglutamic acid. J. biol. Chem. *234* 1830 (1959).
17 Warburg, O. and Christian, W. quoted by Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins IV Protein estimation by ultraviolet absorption in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. VI, p. 55 (Academic Press, New York 1963). Biochem. Z. *310* 384 (1941)
18. Wilmanns, W. Die tetrahydrofolsäureabhängige Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten in normalen und pathologischen weissen Blutzellen. Klin. Wschr. *39*: 884 (1961).
19. Wilmanns, W. Zum Wirkungsmechanismus von 6-Mercaptopurin. Klin. Wschr. *40*: 1170 (1962).
20. Wilmanns, W. Indikation zur Behandlung akuter Leukämien mit 6-Mercaptopurin auf biochemischer Grundlage. Dtsch. med. Wschr. *88*. 900 (1963)
21 Wilmanns, W. Der Stoffwechsel der Einkohlenstoffeinheiten in den unreifen Vorstufen normaler Leukocyten. Med. Welt 2670 (1963)
22. Wilmanns, W. und Jaenicke, L. Die Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für die normale und pathologische Reifung von Blutzellen. Klin. Wschr. *41*. 1077 (1963).

Authors' address: Drs. F. Grignani, M. Martelli, M. Tonato and A. Colonna, Medical Clinic, University of Perugia, *Perugia* (Italy).

Acta haemat. 34 88–100 (1965)

Institut für Hämatologie und Bluttransfusion in Prag (Vorstand: Prof. J. Hořejší);
I. Interne Klinik der Medizinischen Fakultät der Karlsuniversität in Prag (Vorstand: Prof. V. Hoenig)

Stoffwechselveränderungen in Erythrozyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit

Von V. Brabec, J. Bicanová, B. Friedmann, M. Kout, L. Mirčevová, J. Palek, M. Vopatová und V. Volek

Der Mechanismus der gesteigerten Hämolyse bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit wurde bisher nicht genügend aufgeklärt. Obwohl der Zusammenhang zwischen der Umhüllung der Erythrozyten mit inkompletten Antikörpern und ihrem vorzeitigen Absterben unzweifelhaft zu sein scheint, ist diese Beziehung in Wirklichkeit nicht eindeutig. Dies folgt aus der klinischen Erfahrung, daß die Lebensdauer sensibilisierter Erythrozyten bei einigen Patienten zwar stark verkürzt ist, daß sie jedoch bei anderen verhältnismäßig lang ist und sogar nach der Behandlung normal sein kann, obwohl die Sensibilisierung der Erythrozyten andauert. Ungeklärt bleibt auch die Frage, ob die Sensibilisierung der Erythrozyten ihren Stoffwechsel irgendwie beeinflußt, z. B. durch die Hemmung einiger Stromaenzyme. Mit diesem Problem befaßten sich Storti *et al.* (21). Diese Verfasser stellten in vitro eine Herabsetzung der Glykolyse bei Erythrozyten fest, die durch inkomplette Antikörper künstlich sensibilisiert waren. Untersuchungen der Glykolyse von Erythrozyten bei Patienten mit autoimmunen hämolytischen Krankheiten brachten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse (11, 15, 18).

Da das Problem der Veränderung des Erythrozytenstoffwechsels bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit noch nicht gelöst ist und die Hinweise aus dem Schrifttum unvollständig sind, führten die Verfasser bei 20 an dieser Krankheit leidenden Patienten einige biochemische Untersuchungen durch.

Material und Methoden

Die Diagnose der idiopathischen autoimmunen hämolytischen Krankheit wurde grund der klinischen und Laboratoriumsanalyse gestellt. In der ersten Gruppe (I) den sich 14 Patienten mit einem verschiedenen Hyperhämolysegrad. Die zweite pe umfaßte 11 Patienten, bei denen die Hyperhämolyse nach der Behandlung zur i zurückkehrte. Bei 5 Patienten blieb der direkte Antiglobulintest positiv (Gruppe bei weiteren 6 Personen wurde eine komplette Remission erzielt, wobei diese po- Reaktion verschwand (Gruppe II b). 5 Patienten wurden im Verlauf der Krank- viederholt untersucht. 2 Patientinnen (Nr 13 und 14) wurden anhand ihres Krank tadiums in die Gruppen I und II eingereiht und zwei weitere (N 11 und 12) in iruppen I und II b. Eine Patientin (N 17) kam in die Gruppen II und II b.

Das Blutbild wurde auf die übliche Weise untersucht. Die direkte Antiglobulin- i wurde titrimetrisch ausgeführt.

Die Erythrozytenlebensdauer (zum Zeitpunkt der biochemischen Untersuchun- wurde mittels Radiochrom untersucht. Die Blutproben wurden mit 70 µC ^{51}Cr in- ert und vor der Transfusion nicht gewaschen. Als 100% Wert wurde eine Blutprobe 'atienten, die 24 Stunden nach der Transfusion entnommen wurde, betrachtet. Die bnisse werden als Halbwertzeiten der Erythrozytenlebensdauer angeführt, wobei die nalwerte 24 und 34 Tage betragen.

Zur biochemischen Untersuchung wurden die Blutproben von Leukozyten und plättchen befreit (24).

Die *Aktivität der Erythrozytenacetylcholinesterase* wurde manometrisch nach Ammon (1) ttelt. Die Ergebnisse wurden in µl CO_2/0,1 ml Erythrozyten/1 Std. ausgedrückt.

Bei der Bestimmung der *Aktivität der sauren Phosphatase der Erythrozyten* wurde die hode nach King Armstron in Kořineks Modifikation angewandt (15). Eine Phos- teneinheit ist diejenige Enzymmenge in 100 ml Erythrozyten, welche in standarden ngungen aus dem Substrat – Natriumphenylphosphat 1 mg Phenol/Std freisetzt.

Die *glykolytische Aktivität der Erythrozyten* wurde auf manometrische Weise am War gerät bestimmt. Die Ergebnisse werden in µl CO_2/1 ml Erythrozyten/3 Std. Inku- zeit ausgedrückt. (17)

Der *Sauerstoffverbrauch der Erythrozyten* in Gegenwart von Methylenblau wurde am burggerät bei 38° C bestimmt. Die Ergebnisse wurden in µl O_2/1 ml Erythrozyten/ d. Inkubation ausgedrückt (17).

Das *reduzierte Glutathion der Erythrozyten* in mg/100 ml wurde mittels der Nitro- idmethode nach Grunert und Phillips (9) bestimmt.

Die *Stabilität des reduzierten Glutathions* bei der Inkubation mit Acetylphenylhydra- wurde nach Beutler (4) ermittelt in einem glukosehaltigen Medium nach Szeiv- ; (22).

Die *Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase* wurde mittels einer Modifikation spektrophotometrischen Methode nach Kornberg und Horecker (14) bestimmt. Details werden in einer weiteren Mitteilung angegeben (24).

ATP, ADP, 2,3-Diphosphoglyzerat und anorganisches Phosphat der Erythrozyten wur chromatographisch auf Dowex 1 × 8 Cl mit der Methode nach Bartlett (2) be- mt. Die einzelnen Substanzen wurden in den Fraktionen nach der Gradientenelution ch die spektrophotometrische Bestimmung des Adeningehaltes, durch die Bestim- g der Ribose mittels der Orcinolreaktion (7) sowie des Gesamtphosphors nach n-Subbarow in der Modifikation von Bartlett (3) ermittelt. Organische Phosphate den sowohl im frischen Blut als auch nach der Inkubation des Heparinblutes bei C für eine Dauer von 8 und 24 Stunden in der Gegenwart eines Glukoseüberschusses timmt. Die Ergebnisse sind im Mikromol je 100 ml Erythrozyten ausgedrückt.

Außer der Beständigkeit des reduzierten Glutathions und der Phosphatbestim- ng wurden alle Ergebnisse mittels des statistischen t Testes ausgewertet.

Ergebnisse

Die hämatologischen Untersuchungen sind in Tab. I und II angeführt. Tab I enthält die Angaben der Patienten mit gesteigerter Hämolyse. Bei 11 von ihnen wurde eine mittelschwere bis leichte Anämie festgestellt. Die Reticulozytenwerte waren allgemein in einem Bereich von 23 bis 122‰ erhöht. Die Halbwertzeiten der mit Radiochrom markierten Erythrozyten bewegten sich um 11 bis 19

Tabelle I

Klinische und hämatologische Befunde bei Patienten mit gesteigerter Hämolyse (Gruppe I)

Nr	Name, Alter Geschlecht	Krankheitsdauer Monate	Erythrozyten Mill	Hb g%	Reticulocyten ‰	Direkter Antihumanglobulintest, Titer	Halbwertzeit der Erythrozyten ($T_{1/2}$ ^{51}Cr)
1	K. A., 63, ♀	39	3,620	10,4	41	128	14
2.	K. M., 64 ♀	30	3,280	9,8	48	64	16
3.	M. K., 79 ♀	32	4,010	13 1	35	128	16
4	M. M., 5., ♀	15	—	10,1	57	32	—
5.	M. S., 67 ♀	23	2,950	8,2	57	64	13
6.	P. E., 33, ♀	19	2,990	8,5	67	2	—
7	P F 63, ♂	92	3,660	11,8	47	1024	—
8.	R. L., 36, ♀	39	4 180	12,4	23	128	19
9	S. L., 38, ♀	50	3,280	10,7	62	256	16,5
10.	S. F 33, ♂	9	3,510	10,6	59	8	17
11	F L., 16, ♀	1	4,050	12,4	69	32	—
12.	L. H., 16, ♀	1	3,520	10 6	122	2	12
13.	M. Ma., 68, ♀	26	2,930	9,8	49	1024	11
14	V J 16, ♀	1	3,850	10,9	111	16	13

Tage. (Bei 4 Patienten dieser Gruppe wurde eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer bereits früher festgestellt, die Ergebnisse sind *in der Tabelle nicht angeführt.)* Tab. II *enthält die* Angaben derjenigen Patienten, bei denen nach der Behandlung die Hämolyse zur Norm zurückkehrte. In der Gruppe a blieb der direkte Antiglobulintest positiv in der Gruppe b war er negativ Die Werte des roten Blutbildes sind hier allgemein normal. In allen Untersuchungen der Erythrozytenlebensdauer wurden normale Halbzeiten festgestellt. Bei dem Patienten Nr 14 dieser Gruppe konnte die Erythrozytenlebensdauer nicht ermittelt werden er wurde auf Grund der wiederholt normalen Werte des roten Blutbildes und der Reti-

Tabelle II

Klinische und hämatologische Befunde bei Patienten mit normaler Hämolyse. Gruppe IIa Patienten mit positivem direktem Antiglobulintest Gruppe IIb Patienten mit negativem Antiglobulintest und kompletter Remission.

IIa

Nr	Name, Alter, Geschlecht	Krankheitsdauer Monate	Erythrozyten Mill.	Hb g%	Retikulozyten ‰ *	Direkter Antiglobulintest, Titer	Halbwertszeit der Erythrozyten (^{51}Cr)
13.	M.Ma., 70, ♀	51	4,410	13,5	13	8	24,5
14.	V J., 16, ♀	4	4 450	13,3	11	128	—
15.	D M., 75, ♀	79	4,580	14,3	14	32	28
16.	N J 39, ♂	84	5,380	16,2	13	64	26
17	S. J., 37 ♀	40	4,980	15,4	7	128	24

Tabelle IIb

Nr	Name, Alter, Geschlecht	Krankheitsdauer Monate	Erythrozyten Mill.	Hb g%	Retikulozyten ‰ *	Direkter Antiglobulintest, Titer	Halbwertszeit der Erythrozyten (^{51}Cr)
11.	F J 18, ♀	23	4,640	13,8	16	neg	24
12.	L. H., 16, ♀	8	4,740	14,6	13	neg.	24
17	S. J 37 ♀	48	4,100	12,4	10	neg.	—
18.	P M., 42, ♀	46	4,880	15,7	5	neg.	26
19.	R. R., 55, ♂	96	5,200	16,2	12	neg.	31
20.	V M., 65, ♀	45	4,750	13,7	11	neg	24

* wiederholte Untersuchung bei Veränderung des Krankheitsstadiums.

culozytenwerte in diese Gruppe eingereiht. Bei dem Patienten Nr 17 ist das Ergebnis der Erythrozytenlebensdauer in der Gruppe IIa angeführt. Die Patienten, bei denen die Untersuchung bei dem Übergang aus einem Krankheitsstadium in das andere wiederholt wurde, wurden durch einen Stern bezeichnet (*)

Abb 1 enthält die Ergebnisse der Untersuchungen der Erythrozytenglykolyse. Es geht daraus hervor daß die glykolytische Aktivität in ihren Durchschnittswerten in allen Patientengruppen nicht von denjenigen normaler Personen abweicht Bei der Gruppe mit Hämolyse (I) ist die Streuung größer

Abb. 2 bringt die Ergebnisse der Respirationsuntersuchung der Erythrozyten in der Gegenwart von Methylenblau. Bei den Patienten mit Hämolyse wurde eine signifikante Steigerung der Werte festgestellt. Beide Gruppen von Patienten mit einer normalen Erythrozytenlebensdauer zeigen keine Abweichungen von den Normalwerten.

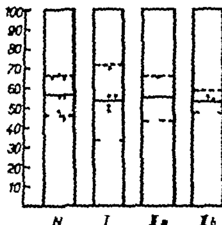


Abb. 1 Glykolyse der Erythrozyten, ausgedrückt in µl CO_2/1 ml Erythrozyten nach 3 Stunden Inkubation.
N: Normalwerte I: Patienten mit gesteigerter Hämolyse; II Patienten mit normaler Erythrozytenhalbwertzeit und positivem direktem Antiglobulintest; IIb: Komplette Remission.

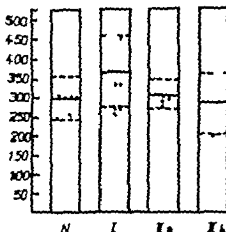


Abb. 2 Erythrozytenrespiration in Gegenwart von Methylenblau, ausgedrückt in µl/1 ml Erythrozyten nach dreistündiger Inkubation. Legende siehe Abb. 1

Tab. III zeigt das Niveau des reduzierten Glutathions vor und nach der Inkubation mit Acetylphenylhydrazin. Die Ergebnisse befinden sich im Bereich der Normalwerte

Abb 3 zeigt daß die Aktivität der Glukoso-6-Phosphatdehydrogenase bei den Patienten der ersten Gruppe signifikant gesteigert ist, während bei denjenigen ohne Hyperhämolyse keine Abweichung von der Norm ermittelt wurde. Infolge der geringeren An-

Tabelle III

Stabilität des reduzierten Glutathions (in mg/100 ml Erythrozyten) nach Inkubation mit Acetylphenylhydrazin bei Patienten mit gesteigerter Hämolyse (*I*) mit normaler Erythrozytenlebensdauer und einem positiven direkten Antiglobulintest (*II a*) und mit kompletter Remission (*II b*)

Glutathion in mg je 100 ml Erythrozyten

Name	vor (Inkubation)	nach (Inkubation)	Name	vor (Inkubation)	nach (Inkubation)
K. A.	62	56	M. Ma.	68	58
K. M.	49	42	V J	58	48
M. K.	69	61	D M.	56	53
M. M.	58	52	N J	73	71
M. S.	58	52	S. J	52	52
P E.	41	23	II		
P F	72	66	S. J	66	61
R. I	70	68	P M.	66	62
S. L.	68	52	R. R.	50	50
S. F	72	66	V M.	66	52
F J	66	66	F J	54	49
L. H.	72	66	L. H.	74	60
M. Ma.	62	62	IIb		
V J	62	58			
I			Normalwerte	65 ± 8	60 ± 8

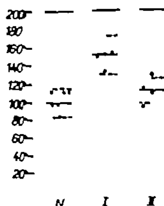


Abb. 3. Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase der Erythrozyten in internationalen Einheiten je 100 ml Erythrozyten.
N Normalwerte; I Patienten mit gesteigerter Hämolyse II Patienten mit normaler Erythrozytenlebensdauer

zahl der Untersuchungen hielten wir es nicht für angebracht, die zweite Patientengruppe in zwei Untergruppen einzuteilen, es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen Patienten mit positivem oder negativem direktem Antiglobulintest festgestellt.

Tabelle IV

Anorganischer Phosphor (AP) 2,3-Diphosphoglycerat (2,3 di PG) ATP und ADP in µM je 100 ml Erythrocyten vor und nach 8- und 24stündiger Inkubation. In der Gruppe I befinden sich Patienten mit gesteigerter Hämolyse, in Gruppe II mit normaler Erythrocytenhaltbarkeit. Gruppe N enthält Angaben über die normalen Durchschnittswerte und Grenzwerte.

I

Name	AP			2,3 di-PG			ADP			ATP		
	0	8	24	0	8	24	0	8	24	0	8	24
M. K.	30	295	498	424	214	29	24	12,2	20	118	117	100
P. F.	37,5	230	467	360	160	29	17	9,3	19,2	106	—	—
R. L.	33	338	428	416	204	81	23	11,7	18,4	133	114	82
S. L.	29	—	—	372	—	—	18	—	—	114	—	—
M. Ma.	37	205	432	360	155	72	17	11	18,5	130	119	72
S. F.	31,5	315	483	392	170	43	22	18	19,5	127	114	91
Durchschnitt	33	281	446	387	181	51	20	10,8	19,1	121	116	87
Bereich	29–37,5	205–338	422–483	360–424	155–214	29–81	17–24	9,3–12,2	18,4–20	106–133	114–119	72–100

II

Name	AP			2,3 di-PG			ADP			ATP		
	0	8	24	0	8	24	0	8	24	0	8	24
F. J.	28	—	—	424	—	—	16	—	—	104	—	—
L. H.	38	276	428	441	200	44	21	8,5	19,0	98	100	72
S. J.	34	241	382	392	174	23	18	10	17,4	104	102	84
F. M.	30,4	232	460	374	220	29	23	10,3	20,3	98	93	76
V. M.	36	283	467	384	193	78	28,6	12	—	108	108	88
Durchschnitt	33,2	258	435	404	197	43,5	21,7	10,4	18,5	102	101	80
Bereich	28–38	232–283	382–467	374–441	174–220	23–78	16–28,6	8,5–12	17,4–20,3	98–108	93–108	72–88

N

Name	AP			2,3 di-PG			ADP			ATP		
	0	8	24	0	8	24	0	8	24	0	8	24
Durchschnitt	34	[illegible]	440	380	180	34	22	[illegible]	20	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Bereich	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

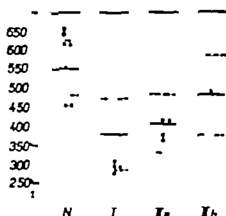


Abb. 4 Aktivität der Erythrozytenacetylcholinesterase, ausgedrückt in µl CO_2/0,1 ml Erythrozyten/1 Std. Legende siehe Abb. 1

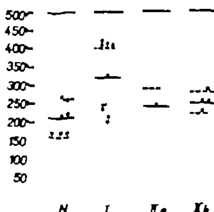


Abb. 5. Aktivität der sauren Phosphatase der Erythrozyten, ausgedrückt in Enzymeinheiten je 100 ml Erythrozyten. Legende siehe Abb. 1.

Weiter wurde der Spiegel des anorganischen Phosphates, des 2, 3-Diphosphoglycerats, ADP ATP sowohl in frischen Erythrozyten als auch nach 8 und 24stündiger Inkubation untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. IV angeführt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Normalwerten und denjenigen der Patienten bei der Gruppen gefunden.

Abb. 4 stellt die Acetylcholinesteraseaktivität dar Die Werte waren bei den Patienten der ersten Gruppe und bei denjenigen ohne gesteigerte Hämolyse mit einem positiven direkten Antiglobulintest signifikant herabgesetzt gefunden während bei den Patienten mit

Tabelle V

Statistische Auswertung der biochemischen Erythrozytenuntersuchungen
Bezeichnung der einzelnen Gruppen siehe Abb. 1

		N	I	IIa	IIb
Glykolyse	X	57	63	55	53
µl CO_2/1 ml		±10	±19	±11	±5
Erythrozyten/3 Std.	t		0,75	0,3	1,2
	P		>0,3	>0,3	>0,2
Sauerstoffverbrauch	X	291	366	304	272
µl O_2/1 ml		± 54	± 97	± 37	± 73
Erythrozyten/3 Std.	t		2,45	0,45	0,5
	P		<0,05	>0,3	>0,3
Glukoso-6-phosphat-dehydrogenase	X	98	151	110*	
I. E./100 ml		±16	± 1	± 14	
Erythrozyten	t		6,09	1,63	
	P		<0,01	>0,1	
Acetylcholinesterase	X	555	331	412	485
µl CO_2/0,1 ml		± 69	± 93	± 78	±104
Erythrozyten/1 Std.	t		5,5	3,57	1,48
	P		<0,01	<0,01	>0,1
Saure Phosphatase	X	216	323	41	251
Einheiten/100 ml		±50	± 78	± 43	± 30
Erythrozyten	t		4,27	0,9	1,29
	P		<0,01	>0,3	>0,1

X = Durchschnitt ± = Standardabweichung
t = Wert des Student' t P = Wahrscheinlichkeit
* = Durchschnittswerte der Patientengruppe IIa und IIb.

kompletter Remission und negativem Antiglobulintest nicht von der Norm abwichen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der sauren Phosphatase der Erythrozyten sind in Abb. 5 dargestellt. Die Aktivität dieses Enzyms ist bei der ersten Patientengruppe signifikant gesteigert, während bei denjenigen ohne gesteigerte Hämolyse (beider Gruppen) keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden.

Diskussion

Wenn die Ergebnisse unserer Untersuchungen aller Patientengruppen mit Normalwerten (Tab. V) verglichen werden, kann festgestellt werden, daß bei den Patienten der ersten Gruppe mit gesteigerter Hämolyse und mit höheren Retikulozytenwerten die Aktivität der sauren Phosphatase, der Glukoso-6-Phosphat Dehy

drogenase und die Respiration der Erythrozyten in Gegenwart von Methylenblau gesteigert ist. Bei der zweiten Gruppe der Patienten waren bei positivem oder negativem direktem Antiglobulintest diese Enzymaktivitäten und die Respiration der Erythrozyten normal. Die Erklärung dieser gesteigerten Enzymaktivitäten in den Erythrozyten der ersten Gruppe der Patienten wird in der höheren Anzahl der Reticulozyten und jungen Erythrozyten dieser Kranken gefunden. Für saure Phosphatase der Erythrozyten stellten VALENTIN *et al.* (23) eine Korrelation ihrer gesteigerten Aktivität mit der Reticulozytose fest. Eine Reihe von Verfassern (8 10 12 20) ermittelte eine höhere Aktivität der Glukoso-6-Phosphat Dehydrogenase bei der Reticulozytose. Die Dehydrogenase des Glukoso-6-Phosphats gemeinsam mit derjenigen des Glukono-6-Phosphats bilden die Hauptenzyme, welche den Sauerstoffverbrauch der reifen Erythrozyten im methylenblauhaltigen Milieu bestimmen (6) Der von uns festgestellte Anstieg des Sauerstoffverbranches bei der Inkubation der Erythrozyten mit Methylenblau bei den Patienten mit Reticulozytose bildet also eine der Folgen der gesteigerten Aktivität der Glukoso-6-Phosphatdehydrogenase in einer jüngeren Erythrozytenpopulation.

Es wurde bei unseren Patienten mit autoimmuner hämolytischer Krankheit keine Glykolysestörung festgestellt. Andererseits fand sich eine Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität bei den Patienten mit Hyperhämolyse sowie bei denjenigen mit einer normalen Halbwertzeit und einem positiven direkten Antiglobulintest, während die Werte bei den Patienten mit kompletter Remission normal waren. Die Herabsetzung der Aktivität war statistisch signifikant, obwohl geringer als bei den Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie, die früher untersucht wurden (5) Für diesen Befund besitzen wir vorläufig noch keine eindeutige Erklärung Es ist möglich, daß es sich um die Inhibition des im Stroma lokalisierten Enzyms durch den an die Erythrozytenoberfläche gebundenen Antikörper handeln könnte. Diese Voraussetzung erfordert jedoch eine experimentelle Bestätigung, um so eher als SABINE (19) bei einigen Patienten mit erworbener hämolytischer Anämie eine normale oder leicht gesteigerte Aktivität dieses Enzyms vorgefunden hat. Wir nehmen jedoch an, daß die herabgesetzte Aktivität der Acetylcholinesterase zur Hyperhämolyse in keiner Beziehung steht, wofür auch die normale Halbwertzeit der Erythrozyten von Patienten der zweiten Gruppe mit einem positiven direkten Anti-

globulintest spricht, die auch eine Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität aufweisen. Dies bezeugt auch die Studie von Metz et al (16) die festgestellt haben, daß die Blockierung dieses Enzyms bei normalen Erythrozyten mittels Octamethylpyrophosphoramid die Halbwertzeit der Erythrozyten bei deren Bestimmung mittels ^{51}Cr keineswegs beeinflußte.

Obwohl die festgestellte Herabsetzung der Acetylcholinesteraseaktivität nicht zur Aufklärung des Hämolysenmechanismus bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit beigetragen hat, so sollte sie doch zur eingehenderen Untersuchung der Erythrozytenmembran, des Gehaltes und des Austausches der Phospholipide und zur detaillierten Untersuchung der Transportmechanismen der Erythrozyten bei dieser Krankheit führen.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß an dem Untergang der sensibilisierten Erythrozyten zugleich mehrere Mechanismen teilnehmen, deren gegenseitiger Anteil an der Destruktion der Erythrozyten veränderlich ist und von einer Reihe bisher unbekannter Faktoren abhängt. Weitere Untersuchungen der biochemischen Veränderungen sensibilisierter Erythrozyten gemeinsam mit der Untersuchung der Erythrophagozytose und der Beziehung zwischen den sensibilisierten Erythrozyten und der Milz könnten vielleicht zu deren Aufklärung beitragen.

Zusammenfassung

Bei Patienten mit autoimmuner hämolytischer Krankheit in verschiedenen Stadien wurden an den Erythrozyten die Glykolyse, die Respiration in Gegenwart von Methylenblau, der Gehalt von ATP, ADP, 2,3-Diphosphoglycerat und anorganischem Phosphor, die Stabilität des reduzierten Glutathions, die Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, der Acetylcholinesterase und der sauren Phosphatase untersucht. Bei Patienten mit Hyperhämolyse und erhöhten Retikulozytenwerten wurden signifikant gesteigerte Aktivitäten der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, der sauren Phosphatase und der Respiration in Gegenwart von Methylenblau festgestellt. Patienten mit einem positiven Antiglobulintest zeigten unabhängig von einer Hyperhämolyse eine herabgesetzte Acetylcholinesteraseaktivität.

Summary

In patients with autoimmune haemolytic disease in various stages of development, glycolysis, cellular respiration in the presence of methylene blue, ATP, ADP, 2,3-diphosphoglycerate and inorganic phosphate content, stability of reduced glutathione, and G-6-PDH, acetylcholinesterase and acid phosphatase activity were determined in the red blood cells. In those with hyperhaemolysis and increased reticulocyte count, significantly higher levels of G-6-PDH and acid phosphatase activity and respiration in the presence of methylene blue were found. Patients with positive antiglobulin test showed reduced acetylcholinesterase activity regardless of whether or not they presented hyperhaemolysis.

Résumé

Chez des malades ayant une hémolyse par auto-immunisation, nous avons déterminé dans les érythrocytes à différents stades de la maladie la glycolyse, le contenu en ATP et ADP le 2,3-diphosphoglycérate, le phosphor anorganique, la stabilité du glutathion réduit, l'activité de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase, l'acétylcholine-estérase et la phosphatase acide. Chez des malades ayant une hyperhémolyse et un nombre élevé de réticulocytes, nous avons trouvé des activités augmentées de façon significative de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase, de la phosphatase acide et de la respiration en présence de bleu de méthylène. Les malades ayant un test d antiglobulines positif montrèrent indépendamment de leur hyperhémolyse, une activité réduite de l'estérase de l'acétylcholine.

Literatur

1. Ammon R. Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. Pflügers Arch. ges. Physiol. 233. 486 (1934)
2. Bartlett G. R. Human red cell glycolytic intermediates. J biol. Chem. 234 449 (1959)
3. Bartlett G R. Phosphorus assay in column chromatography J biol. Chem. 234 466 (1959).
4 Beutler, R. The glutathione instability of drugsensitive red cells. J Lab. clin. Med. 49: 84 (1957)
5. Brabec, V Chmelař, L. Mirčevová, L. Vopatová, M. und Bican, P Untersuchungen über den Stoffwechsel und die Enzymaktivität der Erythrozyten bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie. Folia haemat. (Leipzig) 80: 325 (1963).
6. Brin, M. and Yonemoto, R. H. *Stimulation of the glucose oxidative pathway in* human erythrocytes by methylene blue. J biol. Chem. 230 307 (1958)
7 Dubovský, J Hořejšová, M. Kalousek, F Palek, J und Šorka, J Spektrophotometrische Methode zur Aktivitätsmessung des Pentosecyclus in Erythrozyten. Collection Czechoslov Chem. Commun. 24 1234 (1959).
8. Friedman, M. M. Kahn, B. S. and Lapan, B. Dehydrogenases of regenerating red blood cells in phenylhydrazine anemia. Clin. chem. 8. 486 (1962)
9. Grunert R. R. and Phillips, P H. A modification of the nitroprusside method of analysis for glutathione. Arch. Biochem. 30: 217 (1951)
10. Hennemann, H. M. Die Erhöhung der Glukose-6-Phosphat-dehydrogenaseaktivität der Erythrozyten und ihre klinische Bedeutung Klin. Wschr 41 1014 (1963).
11 Hollingsworth, J W Erythrocyte glycolysis in hemolytic disease. J lab. clin. Med. 45: 920 (1955).
12. Kaphengst, C. und Rapoport S Atmung und Glukose-Phosphatdehydrogenase-Aktivität roter Blutkörperchen in verschiedenen Reifungs- und Alterungsstadien. Folia haemat. (Leipzig) 78. 140 (1962).
13. Kořínek, J in Hořejší, J und Slavík Základy chemického vyšetřování lékařství. Státní zdrav nakl. Praha, 1957
14 Kornberg, A. Horecker, B. L. in Colowick, S. P ; Kaplan N. O *Method in* enzymology 1. 232 (Academic Press, New York)
15. Löhr, G W und Waller, H. D Hämolytische Erythrocytopathie durch Fehlen von Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase in roten Blutzellen als dominant vererbliche Krankheit. Klin. Wschr 36. 865 (1958).
16. Metz, J ; Stevens, K. von Riesenberg, N J and Hart D Failure of in vivo inhibition of acetylcholinesterase to affect erythrocyte life-span the significance of the enzyme defect in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Brit. J Haemat. 7 458 (1961).

17. Mirčevová, L. and Vortková, J.: Some biochemical changes in the stored ACD blood. Vox. Sang. 6. 179 (1961)
18. Prankerd, T. A. J.: The red cell, p. 118 (Blackwell, Oxford 1961).
19. Sabine, J. C.: Erythrocyte cholinesterase titers in hematologic disease states. Amer. J. Med. 27 81 (1959)
20. Sailer, S.; Sandhofer, F. und Braunsteiner, H. Enzymgehalt der Erythrocyten und effektive Erythropoese. Wien. Z. inn. Med. 44 31 (1963).
21. Storti, E. Vaccari, F. and Baldini, E. Changes in red cells metabolism in presence of incomplete antibodies. Experientia 12: 108 (1956)
22. Szeinberg, A.; Asher, Y. and Sheba, Ch.: Studies on glutathione stability in erythrocytes of cases with past history of favism or sulfa-drug-induced hemolysis. Blood 13. 348 (1958)
23. Valentine, W. N. Tanaka, K. R. and Fredericks, R. L.: Erythrocyte acid phosphatase in health and disease. Amer. J. clin. Path. 36. 328 (1961).
24. Volek, L. Palek, J.; Friedmann, B. und Brabec, V.: Aktivita glukoso-6-fosfátdehydrogenasy u hemolytických stavů. Čas. lék. čes. (im Druck)

Adresse des Autors: Dr. V. Brabec, *U nemocnice 1, Prag 2* (Tschechoslowakei).

Acta Medic. 37: 107–113 (1968)

Institute of Forensic Medicine (Director: Prof. Dr. E. Laufer), University of Berne

Desorption of Some Toxic Heavy Metals from Human Erythrocytes in vitro

By Hanspeter Wyss

Toxic heavy metals may be transported in the blood stream, at least partly by carrier substances such as blood cells, plasma proteins and/or other organic compounds. The centrifuging and primary subdivision of poisoned full blood shows that lead is attached to the erythrocytes approximately up to 96% (2). After Clarkson et al. (3) inorganic mercury is attached to 50% to the erythrocytes, whereas Swensson et al. (17) point out that the cellular-bound fraction is only about 20%. Thallium is distributed equally between the plasma and the red cells (12, 18). Many interactions exist, however, between the surfaces of the erythrocytes and the surrounding plasma. More loosely bound components, mainly lipoproteins and lipids, can be removed easily from the membrane of the erythrocytes by repeated washings in saline (11), whereas a certain amount of plasma protein is adsorbed rather firmly (8). The film of plasma protein on the erythrocytic surface distinguishes itself essentially from the plasmatic proteins in its qualitative composition (6, 14).

The question now arises if there is a real binding of the mentioned heavy metals to ligands of the insufficiently defined cell membrane (16), or if the surface binding could be due, at least partly, to a cellular adsorption of plasma components which might hold the metals. If the latter assumption is true, the removal of such components from the erythrocytic surface must lead to the desorption of heavy metals which are apparently fixed to the cells also.

This was investigated by experiments in vitro on human erythrocytes charged with heavy metals. According to the experi-

ments of JONES AND GARDNER (8) we suspended the erythrocytes, which had been incubated with metals and washed repeatedly beforehand, in their own plasma or in individual plasma fractions. With this procedure, a considerable amount of plasma components can be removed from the erythrocytic surface. The removal of lead, mercury and thallium into the surrounding medium was determined. Our results lead to the hypothesis that lead is bound chiefly to the deeper protein layers of the erythrocytic surface whereas mercury is rather fixed to lipoproteins, lipids and/or smaller thiols of the outer surface. Thallium apparently shows no definite predilection to binding-sites either in the plasma or in the cells.

Materials

Blood. Blood from healthy young donors (group 0) was collected and used immediately or within 24 hours (storage t 4 °C) Anticoagulant: heparine (Liquemine® Roche). Plasma was obtained by centrifuging during 25 mi at 3000 g (temperature 0 °C).

Radioactive metal-salts: Pb^{210}* as lead acetate, specific activity 50 mC/mM, 1 mC dissolved in 0.5 ml of 8 n acetic acid. The product obtained was diluted with distilled water to an activity of 20 µC/ml. Hg^{203}* as mercuric chloride, specific activity 1 C/g Hg, dissolved in 0.9% saline to 40 µC/ml. Tl^{204} as thallium sulfate, dissolved in 0.9% saline to 20 µC/ml.

Washing liquids: W used the following washing liquids

- Isotonic solution of potassium chloride (1 19%) pH 6.9
- Isotonic phosphate buffer pH 7 4 and pH 6.0, respectively
  Heparinized plasma compatible to the erythrocytes used.
- Plasma fractions solutions containing 4 g% of protein were prepared by dissolving the following materials in phosphate buffer t pH 7 4 or t pH 6.0 lyophilized albumin, lyophilized gamma globulin and precipitate IV prepared according to KISTLER AND NITSCHMANN (10)
- Plasmaexpanders Physiogel® SRK 4.2% isotonic solution of gelatine molecular weight 30,000, pH 7.2[4] Macrodex® (Pharmacia, Uppsala), a high-molecular 6% solution of dextrane in saline, pH 7.5[4] Periston® (Bayer Leverkusen) 4% solution of high-molecular weight polyvinylpyrrolidone (PVP) isotonic with electrolytes, pH 7 4

Radioactive estimations The γ-rays emitted by Pb^{210} and Hg^{203} were estimated in well-type NaI (Tl) scintillation detector 5 ml samples of liquid being measured. β-rays emitted by Tl^{204} were estimated under Geiger Müller end-window tube (2 mg/cm^2) after drying 2 ml of liquid in metal-dishes under an infrared lamp. All estimations were made immediately after each experiment by counting at least 2000 counts with time-limit of 10—20 min. Philipps-apparatus with one-channel discriminator scaler and highly stabilized high-voltage supply

---

Furnished by the Radiochemical Center Amersham, England.

Furnished by the Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen, Switzerland.

Furnished by the Central Laboratory of the Swiss Red Cross, Blood Transfusion Service, Berne Switzerland

Own determinations (glass electrode).

Methods

Preparation of metal-incubated red cells Blood samples were mixed with 1—2 μC radioactive metal-solutions per 1 ml of blood, allowed to stand for 60 min at room temperature, then the activity of 1 ml was measured. The blood was sharply centrifuged afterwards and samples of plasma and packed red cells taken for radioactivity estimations.

Removal of metal from red cells during repeated washings: 1 ml of packed erythrocytes was mixed with 10 ml of washing liquid and centrifuged during 4 min at 4000 rpm. Of the supernatant liquid an aliquot sample was taken for activity-determination and the remainder discarded. The cells were then resuspended in 10 ml of fresh washing liquid, allowed to stand for 15 min and centrifuged again. This procedure was repeated 12 times. After the 12th washing, the cell deposit was hemolyzed and the remaining activity in the sediment was estimated.

Calculations: The distribution of the metals between the erythrocytes and the plasma was calculated from the activity found in whole blood, in plasma and in the red cell deposit. The desorption of the metals from the incubated red cells into the washing liquids was calculated in the following manner for each washing procedure, the number of counts per minute (cpm) removed was known measuring the activity in the respective washing liquids. The sum of the cpm removed in 12 washing procedures from the cells and the cpm remaining in the red cell deposit at the end of the experiment was taken as the initial activity (100%) Recoveries, as compared with the activity in 1 ml of packed cells before washing were good. From this initial activity was subtracted subsequently the cpm removed in each washing procedure. The calculated activity remaining in the red cell deposit after each washing was expressed as percentage of the initial activity The results were plotted semilogarithmically as desorption curves (remaining activity on ordinate against number of washing procedures on abscissa).

Results

1 Lead

Freshly drawn blood or blood stored for about 24 hours was incubated for 60 min with Pb^{210} acetate. Then the erythrocytes were separated from the plasma. 90—95% (average 92%) of the added Pb^{210} was found regularly in the red cell deposit.

Desorption of lead by washing erythrocytes in plasma. Lead-incubated red cells were washed 12 times with KCl-solution approximately 2—3% of the Pb^{210} content was removed with each washing When we replaced the KCl-solution after the 6th washing with plasma, more Pb^{210} could be removed from the erythrocytes. The reverse procedure (washings No 1—6 with plasma, No. 7—12 with KCl-solution) led to a pronounced removal of Pb^{210} from the cells during the first 6 washings, whereas afterwards only a negligible desorption-effect could be observed (fig 1)

Effect of phosphate citrate and pH Pb^{210} laden red cells were washed 6 times with KCl-solution. Samples of them were then washed 6 times more in either phosphate-buffer pH 7 4 citrated

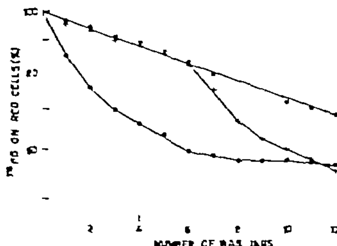


Fig 1 Removal of Pb^{210} from incubated red cells by repeated washings. Sample A (O) was washed 12 times with KCl-solution. Sample B (+) was washed 6 times with KCl-solution and then 6 times more with plasma. Sample C (●) was washed first 6 times with plasma, followed by 6 washings with KCl-solution.

phosphate buffer or in plasma. The plasma removed 13.5% more Pb^{210} from the cells than did the phosphate-buffer and 12.5% more than the citrated buffer Analogue results were obtained in experiments in which we used a plasma containing the same phosphate concentration as the buffer

Fig 2 represents the removal of Pb^{210} from erythrocytes at various pH. 12 washings in phosphate-buffer pH 7 4 removed 23% of the initially present Pb^{210} from the erythrocytes, whereas plasma (pH 7 7) removed 35 The difference of 12 agrees with that of fig 1 where we compared the effect of plasma to the effect of KCl-solution (pH 6.9) Lowering the pH of buffer and plasma to pH 6.0 gave the following results considerably more Pb^{210} was desorbed under these conditions during the first washings (fig. 2) A partial flocculation of the erythrocytes was observed after the 5th washing in acidified plasma, but not in the acid buffer It was observed, however that plasma had removed 20 more Pb^{210} after the 5th washing, before flocculation had occured.

Washings with plasma fractions: In further experiments we used 4% solutions (pH 7 4) of albumin, gamma-globulin and precipitate IV a heterogeneous mixture of alpha- and beta-globulins. Fig 3 shows that albumin removes only slightly more Pb^{210} from the red

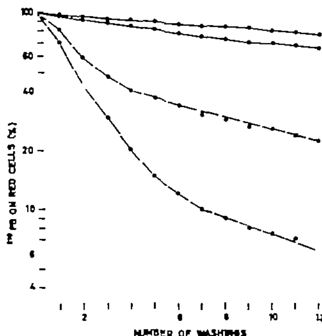


Fig. 2. Removal of Pb^{210} from incubated red cells by washings at pH 7.4 (uninterrupted lines) and pH 6.0 (dotted lines). Open circles: 12 washings with phosphate-buffer; shadowed circles: 12 washings with plasma.

Table I

Removal of Pb^{210} from red cells by washings with plasmaexpanders.

No. of washings	*A*	*B*	*C*	*D*
1	98.6	97.1	97.5	97.8
2	95.2	95.8	96.0	96.5
3	92.6	94.1	93.6	94.1
4	90.5	91.7	93.3	92.1
5	88.5	89.5	88.5	90.2
6	86.4	87.3	86.7	88.2
7	84.4	82.6	83.8	87.2
8	82.4	78.1	81.2	87.2
9	80.4	73.3	78.7	86.0
10	78.6	68.2	73.9	84.7
11	76.6	62.6	72.8	83.2
12	74.6	57.8	69.6	81.9

Four samples of incubated erythrocytes were washed 6 times with KCl-solution. Washings No. 7—12 were performed on sample A with KCl-solution (controls), on sample B with Physiogel®, on sample C with Macrodex® and on sample D with Periston®. Results are given as percentage of the initial activity (100%) remaining in the red cell deposit after each washing.

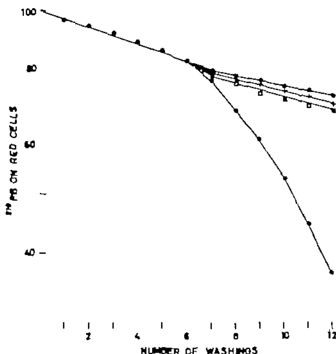


Fig 3. Four samples of red cells incubated with Pb^{210} were washed 6 times with phosphate-buffer After the 6th washing, sample A (O) was washed further with phosphate-buffer sample B (□) with albumin, sample C (+) with gamma-globulin and sample D (●) with precipitate IV (4% solutions at pH 7 4)

cells than the phosphate buffer Gamma-globulin had no effect at all whereas precipitate IV removed 35 / more Pb^{210} from the erythrocytes compared with the buffer

Experiments with these solutions acidified to pH 6 0 followed identical desorption curves as represented in fig 2. Flocculation of the red cells did not occur Gamma-globulin removed 7.2 % albumin 11.5% and precipitate IV 12.7% more Pb^{210} from the red cells than the acid buffer solution alone.

Washings with plasmaexpanders Pb^{210} incubated red cells were washed 6 times with KCl-solution. Sample A was then washed 6 times more with KCl, sample B with Physiogel ● sample C with Macrodex ● and sample D with Periston ● Results are given in table I It was observed that after washings with Physiogel ● the activity of Pb^{210} in the red cell deposit decreased to a greater extent than with KCl or Macrodex ● whereas Periston ● seemed rather to prevent the desorption of Pb^{210} from the cells

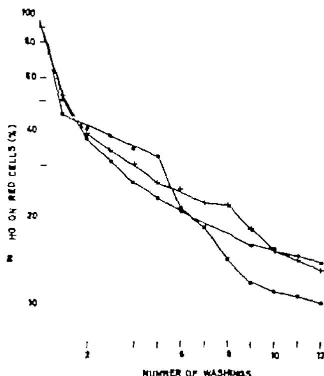


Fig. 4 Removal of Hg[203] from incubated red cells by washing. Sample A (O) was washed 12 times with phosphate-buffer sample B (+) was washed 6 times with buffer and then 6 times more with plasma, *sample C (●) was washed first 6 times with plasma, followed* by 6 further washings with buffer

2. *Mercury*

The distribution of Hg^{203} between erythrocytes and plasma was dependent upon the blood used in freshly drawn blood, an average of 26% of the added metal attached to the cells, whereas in blood stored for about 24 hours, 45—55% of Hg^{203} was found in the red cell deposit. Erythrocytes washed 6 times with KCl-solution and *incubated in* Hg^{203} *containing saline fixed up to 72% of* Hg^{203} cells washed 12 times even more than 80 %. The more Hg^{203} initially taken up by the cells, the less could be removed in 12 washings in buffer solution or even in plasma.

Washings with plasma. Fig 4 shows the results obtained one sample of Hg^{203} laden red cells was washed first 6 times with buffer pH 7 4 then another 6 times with its own plasma. A second sample

Table II

Removal of Hg^{203} from incubated red cells by washings with plasma.

No. of washings	A	B	C
1	64.9	66.3	72.7
2	49.2	51.6	68.1
3	39.8	42.6	65.4
4	33.1	36.2	54.8
5	28.5	32.2	50.7
6	25.9	29.5	45.3
7	24 1	26.1	37.9
8	22.8	25.0	29.0
9	22.0	24.7	26.0
10	21.5	24.1	25.5
11	20.6	23.8	24.3
12	20.2	23.3	23.4

Same type of experiment as represented in fig. 4, whereby however red cells and plasma of another donor were used. Sample A washings No. 1—12 with phosphate-buffer Sample B: washings No. 1—6 with buffer No 7—12 with plasma. Sample C: washings No. 1—6 with plasma, No. 7—12 with buffer The results indicate that sometimes even more Hg^{203} remained in the red cells by pre-washing them with their own plasma (sample C).

was washed 6 times with plasma followed by the same number of washings with buffer Red cells washed 12 times in buffer served as control. In all samples there was a quick first removal of Hg^{203} from the erythrocytes, followed by a second rather slow decrease. The activity of Hg^{203} in the red cell deposit seemed to approach a final level asymptotically The use of plasma instead of buffer had no influence upon the metal desorption. In some experiments we could even observe that by pre washing the cells with plasma more Hg^{203} was retained by the erythrocytes, whereas in subsequent washings with buffer solution the same final level was reached as in the control-experiment (table II)

Washings with plasma fractions and plasmaexpanders. After Hg^{203}-incubated red cells were suspended and centrifuged 6 times with buffer-solution, neither a 4% solution of albumin nor gamma-globulin was able to desorb more Hg^{203} from the erythrocytes than the inorganic medium alone. Suspending the cells first 6 times in these solutions produced no increased retention of Hg^{203} in the cell fraction. If we used a 4 % solution of precipitate IV we made the following observations with stored red cells, the desorption-curves for 12 washings in buffer or 6 washings in buffer followed by 6 washings with precipitate IV were quite identical and similar to

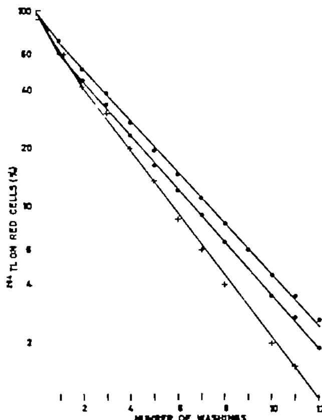


Fig. 5. Removal of Tl^{204} from incubated red cells by washing. Sample A (O) washings No. 1—12 with phosphate-buffer. Sample B (+) washings No. 1—6 with phosphate-buffer, No. 7—12 with plasma. Sample C (●) washings No. 1—6 with plasma, No. 7—12 with phosphate-buffer

those represented in fig. 4 If however the erythrocytes were first washed with precipitate IV desorption of Hg^{203} was decreased, whereas in the 6 subsequent washings with buffer approximately the same final level was approached as for the controls. The same experiment performed with freshly drawn cells showed no retention of Hg^{203} in the red cell depont.

Liquids used for washing of pH 6.0 produced a sharp fall during the first three washings to a level of 10—20% of the initial activity In the following steps almost no further Hg^{203} could be removed. There were no differences between acid buffer and acidified plasma protein-solutions. Experiments with plasmaexpanders gave no significant results.

Table III

Removal of Tl^{204} from incubated red cells by washings.

No. of washings	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M
1	64.8	59.7	62.4	67.3	64.7	60.1	61.9	58.5	55.6	57.9	63.1	62.3
2	46.3	44.8	47.6	46.6	44.2	39.8	41.1	39.8	36.5	44.8	49.2	48.3
3	31.1	33.3	37.7	30.2	27.4	25.9	26.9	26.8	23.1	32.6	35.0	33.3
4	23.1	27.2	27.6	21.6	19.5	15.9	17.1	16.9	14.2	26.3	27.4	27.8
5	17.0	21.8	20.6	14.6	13.0	11.9	11.2	11.1	8.7	20.3	21.2	21.6
6	13.3	17.1	14.5	10.6	8.2	8.1	7.1	7.3	5.2	15.4	15.8	16.3
7	9.4	12.5	11.5	7.5	5.4	5.5	5.4	5.5	4.1	12.3	10.5	12.9
8	7.0	9.9	8.8	5.4	2.5	3.4	4.1	4.1	3.9	10.5	7.0	10.9
9	3.8	7.6	5.8	3.1	0.6	2.4	3.3	3.3	2.4	9.2	4.7	9.7
10	2.9	6.0	4.1	2.3	0.2	1.6	2.7	2.6	2.0	8.1	2.8	7.6
11	2.1	4.4	2.5	1.6	0.1	1.2	2.3	2.3	1.6	7.0	1.8	6.4
12	1.4	3.4	1.4	1.1	0.1	0.8	1.8	1.9	1.3	6.1	1.0	5.4

The data given in this table represent the percentage of initial activity of Tl^{204} remaining in the red cell deposit after each washing. The following washing liquids had been used Sample A washings No. 1—12 with phosphate-buffer pH 7.4. Sample B washings No. 1—12 with KCl-solution, pH 6.9 Samples C, D and E: washings No. 1—6 with phosphate-buffer pH 7.4 followed by another 6 washings (No. 7—12) with albumin (sample C) gamma-globulin (sample D) or precipitate IV (sample E) 4% solutions, pH 7.4. Sample F washings No. 1—12 with phosphate-buffer pH 6.0. Samples G, H and I washings No. 1—6 with phosphate-buffer pH 6.0, followed by another 6 washings (No. 7—12) with 4% solutions at pH 6.0 of albumin (sample G) gamma-globulin (sample H) or precipitate IV (sample I) Samples K, L and M: 6 times with KCl-solutions washed red cells were washed for another 6 times (washings No. 7—12) with Physiogel● (sample K) Macrodex● (sample L) or Periston● (sample M)

3 *Thallium*

In all our experiments, the distribution of Tl^{204} between red cells and plasma followed the same constant pattern and did not depend upon the ageing of the cells. Between 50—59% Tl^{204} was found in the erythrocytes (average value 56%)

Washing-experiments The results of all performed experiments were almost identical in 12 washings, practically all the activity of Tl^{204} could be removed from the red cells into the liquids used for washing On an average, 2% of the initially present activity remained in the red cell deposit at the end of the washing procedure. Fig 5 shows a typical experiment. The desorption-curve represents a simple exponential function. Experiments performed with albumin, gamma-globulin or precipitate IV followed the same pattern, independent of pH. Experiments with plasmaexpanders gave analogue results (table III)

Discussion

Experiments on rats allowed us to formulate some provisional working hypotheses on the protein transport of heavy metals (19—21) It was therefore desirable to differentiate the problem in further studies. Experiments on human erythrocytes in vitro were judged promising to furnish more information for the following reasons repeated washing of erythrocytes in saline removes some plasma proteins (13) and mainly lipids (11) from the surface of the red cells. But this desorption is a fairly complete one, and only by suspending erythrocytes in their own plasma can the more firmly bound surface molecules be exchanged against proteins and lipids of the liquid used for washing These more firmly bound components represent lipids from 80 to 95 % and plasma proteins up to 25% of all the electrophoretically separated fractions of serum proteins (8) The protein film covers about 10 % of the erythrocytic surface (14)

We were able to demonstrate that *lead* is removed from the erythrocytes to a greater extent by repeated washings in their own plasma than in pure inorganic medium. It was possible to eliminate the influence of phosphate- and citrate ions or the pH as a reason for the above result. *In a heterogenous mixture of alpha and beta* globulins including lipoproteins (precipitate IV [10]) even more lead was desorbed from the cells than in plasma, albumin or gamma-globulin solutions. It may be concluded that a not inconsiderable amount of apparently cellular bound lead lies in the alpha and beta-globulin fractions of the protein film on the erythrocytic surface, this film (and therefore the lead, too) being exchangeable under appropriate conditions. We suppose therefore that lead is bound at least partly to the deeper layers of the plasma protein film on the erythrocytic surface. This view is confirmed by electron-microscopic studies (9) experiments dealing with the surface pH of lead intoxicated red cells (15) and investigations upon the qualitative composition of the red cell surface proteins (6) The question, however remains open as to which proteins contained in our solutions of precipitate IV are chiefly involved in lead fixation the metalbinding proteins such as transferrin and coeruloplasmin or may be lipoproteins could be taken into account.

However complete desorption of lead from the cells was never obtained in our experiments. This could be explained as follows

1 According to JONES AND GARDNER (8), even after 7 washings, 25—60% of the proteins bound to the erythrocytic surface remains deposited in the cells, whereas lipids are removed almost completely Therefore complete desorption of all the lead-carrying molecules may not be expected.

2. Not all the lead on the erythrocytes is bound by proteins some form, at least in part, colloidal phosphate sol on their surface, as proposed by CLARKSON AND KENCH (4).

3. The possibility has to be considered that some lead penetrates into the cells during the experiment.

Among the plasmaexpanders tested Phynogel ● removed lead to a great extent from the cells. The effect of Macrodex ● was comparable to that of albumin (only slight removal) whereas Periston ● seemed rather to prevent a desorption. It might be probable, therefore, that gelatine removes adsorbed plasma proteins from the red cells, whereas PVP exerts rather a binding effect. However the question remains unsettled in view the fact that little is known about the interactions of plasmaexpanders and erythrocytes. Perhaps the tentative treatment of lead poisoning with Physiogel ● could give further information, at least from a practical standpoint.

The behaviour of *mercury* in our experiments was quite different from that of lead. During repeated washings of poisoned cells in inorganic medium, the concentration of mercury in the red cell deposit fell at first in fast steps, later rather slowly The content of the red cells on mercury seemed to reach a final level asymptotically Neither with plasma nor with its fractions could more mercury be removed from the cells. Sometimes, plasma or precipitate IV seemed even to bind the metal to the cellular surface.

After performing experiments with paper-electrophoresis, CLARKSON *et al.* had pointed out that mercury is bound to the albumin fraction (3) This protein is rather loosely adsorbed on the surface of the red cell (14) Our results could therefore agree with the hypothesis of an albumin-binding capability of mercury Against this view are the following arguments in paper-electrophoresis, the albumin peak does not represent at all a homogeneous fraction immunochemical analysis detects other proteins in this band, too, especially some of the faster lipoproteins (5) Then there are other substances which are carried by albumin (1) and which might simulate a binding of mercury to this fraction. As LOVELOCK (11) was able to demonstrate, red cells are depleted by repeated washings in saline of superficial lipid components first rapidly later slowly Thus, the possibility might be considered that mercury binds to the red cells by means of superfical, only loosely adsorbed

lipoproteins and/or serum lipids. Consistent with this view would be the chemical properties of mercury (7) and experimental results on rats (20) The observation of a binding effect of some plasmas or precipitate IV for mercury to the cell surface could then be explained by a re-uptake of such substances by the cells from the lipid-containing liquid used for washing

Mercury shows a marked affinity towards SH-groups which are widely distributed in the whole blood in form of smaller thiols, proteins and even haemoglobin (7) This fact has to be taken into account if one tries to estimate the binding sites of mercury to the various blood-components. In this connection, we made an observation in our experiments unwashed red cells fixed less metal than pre-washed ones, which had been depleted from their surrounding film of plasma proteins and lipids, at least partly The smaller this film seems to be, the greater is the amount of mercury fixed on the cells themselves, from where it can be removed by consequent washings in plasma or inorganic medium only with more difficulty and more incompletely Ageing of cells seems to play not yet elucidated role, too, since older cells fix more mercury than freshly drawn ones.

Thallium was distributed about equally between the red cells and the plasma our results agree with those of others (12, 18) All experiments gave identical results in the course of 12 washings, the thallium content of the cell deposit decreased in the same manner independent of the liquids used for washing The desorption-curves followed a simple exponential function graphically An almost constant final level in the red cells was reached, about 2% of the initial thallium content. Therefore there exists a not yet clearly defined equilibrium between the thallium content of red cells and the surrounding medium. The observed removal of thallium from the cells might be considered as a phenomenon of pure diffusion the underlying mechanism is not clear Therefore we are not allowed to postulate a direct binding of this metal to serum components or red cells. This agrees with animal experiments on the intestinal excretion of thallium (21)

Our conclusions are based upon results obtained by indirect methods. They may therefore not possess the same value as chemical analyses of the binding of heavy metals to the components of the plasma. However it has been demonstrated that there may exist some interactions between red cells and the surrounding proteins and lipids containing medium. The problem of the transport function and transport-capacity of the plasma components for heavy metals requires further investigation.

Acknowledgements: I am particularly indepted to Prof. Dr G. WAGNER and Dr W ROTTMANN (Federal Office of Public Health, Dept. of Radiological Protection)

who generously allowed me to use their laboratories. My thanks are due to Prof. Dr. E. LÄUPPI and PD Dr. A. HÄSSIG for their continued interest in this investigation. I am grateful to Dr. K. STAMPFLI and Dr. P. KISTLER (Central Laboratory of the Swiss Red Cross, Blood Transfusion Service) for generously providing blood, plasma and protein fractions. Technical assistance was given by Miss U. BLASER. Dr. ALICE JAMES and Mrs. T. V. HESS-JABOOR helped in preparing the manuscript.

Summary

Human red cells were incubated in vitro with Pb^{210}, Hg^{203} and Tl^{204} and thereafter washed repeatedly with different washing liquids. The desorption of these metals from the erythrocytes was determined. Under the conditions of our experiments we observed a marked difference in the removal from apparently cellular bound metal into the surrounding medium between Pb^{210}, Hg^{203} and Tl^{204}. Preliminary conclusions are drawn about the possible binding sites of the examined metals on the red cell surface.

Résumé

Nous avons incubé des globules rouges humains avec du Pb^{210}, du Hg^{203} et du Tl^{204}. Les hématies ont été soumises ensuite à des lavages répétés dans des solutions différentes. Le Pb^{210}, le Hg^{203} et le Tl^{204} se détachaient d'une manière nettement différente de la surface des érythrocytes. Grâce aux résultats obtenus dans nos conditions expérimentales, nous avons tiré quelques conclusions préliminaires sur la nature éventuelle de l'attachement des métaux en rapport à la surface érythrocytaire.

Zusammenfassung

Menschliche Erythrozyten wurden in vitro mit Pb^{210}, Hg^{203} und Tl^{204} inkubiert und anschließend mit verschiedenen Waschflüssigkeiten wiederholt gewaschen. Die Desorption der Metalle von den Erythrozyten wurde verfolgt. Die unter unseren Versuchsbedingungen gewonnenen Desorptionskurven von Pb^{210}, Hg^{203} und Tl^{204} waren voneinander verschieden. Es werden einige vorläufige Schlußfolgerungen über die Bindung dieser Metalle an Bestandteile der Erythrozytenoberfläche gezogen.

References

1. BERNHOLD, H. Blutkreislauf und Transportvorgänge im menschlichen Körper. Klin. Wschr. *41* 109–119 (1963).
2. CASTELLINO, N. Acquisitions récentes en toxicologie industrielle au moyen de radio-isotopes. Contribution à l'étude du métabolisme du Pb^{210}. Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. *20* 237–252 (1963).
3. CLARKSON, T. W., GATZY, J. AND DALTON, CH. Studies on the equilibration of mercury vapor with blood. Univ. of Rochester AEP Rep. No. 582 (1961).
4. CLARKSON, T. W. AND KENCH, J. E. Uptake of lead by human erythrocytes in vitro. Biochem. J. *69*: 432–439 (1958).
5. GRABAR, P. ET BURTIN, P. Analyse immuno-électrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains. 1ère éd. (Masson, Paris 1960).
6. GRAMLICH, F. UND MÜLLER, H. E. Weitere Untersuchungen zum Serumproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrozyten. Acta haemat., Basel *30*: 236–243 (1963).
7. HUGHES, W. L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. Ann. N. Y. Acad. Sci. *65*. 454–460 (1957).

8. Jones, N. C. H. and Gardner, B. The exchange of ^{131}I-labelled lipid and ^{131}I labelled protein between red cells and serum. Biochem. J. *85:* 404–413 (1962)
9. Jung, F.: Zur Pathologie der roten Blutkörperchen. II. Mitteilung: Wirkungen einiger Metallsalze. Arch. exp. Path. Pharmakol. *204:* 139–156 (1947).
10. Kistler, P. and Nitschmann, Hs. Large scale production of human plasma fractions. Vox Sang. *7:* 414–424 (1962).
11. Lovelock, J. E. The physical instability of human red blood cells. Biochem. J. *60:* 692–696 (1955).
12. Lund, A. Distribution of thallium in the organism and its elimination. Acta pharmacol. toxicol. *12:* 251–259 (1956).
13. Micheli, A. Contribution à l'étude immunochimique des hémolysats de globules rouges humains. Enzym. biol. clin. *2:* 82–98 (1962/63).
14. Müller, H. E. und Gramlich, F. Die normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten. Z. physiol. Chem. *334:* 103–115 (1963)
15. Passow, H. und Weiss, Ch. Das Grenzflächen-pH roter Blutkörperchen in Gegenwart von Schwermetallionen. Pflügers Arch. ges. Physiol. *271:* 374–377 (1960)
16. Ponder, E. The cell membrane and its properties; in Brachet's and Mirsky's The Cell, vol. II, pp. 1–84 (Academic Press, New York/London 1961).
17. Swensson, A.; Lundgren, K. D. and Lindström, O. Distribution and excretion of mercury compounds after single injection. Arch. industr. Hlth. *20:* 432–443 (1959).
18. Truelson, N. Experimental investigation on thallium poisoning in the rat. Acta derm.-vener. *31:* 3–27 (1951)
19. Witschi, H. P. Tierexperimentelle Untersuchungen zur enteralen Bleiausscheidung. Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. *20:* 449–460 (1964)
20. Witschi, H. P. Untersuchungen über die intestinale Ausscheidung von Quecksilber bei Ratten. Beitr. gerichtl. Med. *23:* 288–296 (1965)
21. Witschi, H. P. and Läuppi, E. Intestinal protein-loss and excretion of some toxic heavy metals. 3rd Symp. on Physiology and Pathophysiology of Plasma Protein Metabolism, Grindelwald 1964 (Huber, Bern 1965)

Author's address: Dr. H. P. Witschi, Toxicology Research Unit, Medical Research Council Laboratories, Woodmansterne Road, *Carshalton/Surrey (England).*

Acta haemat. 34: 116–126 (1965)

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Innsbruck (Vorstand: Prof. Dr. H. Braunsteiner) und dem Department of Haematology (Vorstand: Prof. Dr. J. V. Dacie) und Radiotherapy der Postgraduate Medical School, London

Die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrozythenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien

Von H. Huber*, S. M. Lewis und L. Szur

Wegen ihrer Einfachheit und guten Reproduzierbarkeit gehört die Bestimmung von Blutvolumen (BV) und zirkulierender Erythrozytenmenge (EM) zu den Standardmethoden klinischer Isotopenlaboratorien. Allerdings sind diese Bestimmungen nur dann indiziert, wenn konventionelle Methoden nicht befriedigen oder die Untersuchten und Untersucher mehr belasten. Bei Polycythaemia vera (1–7) und sekundären Polyglobulien (8–12) wurden BV und EM von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt; ein systematischer Vergleich mit den Ergebnissen konventioneller hämatologischer Untersuchungen fehlt unseres Wissens jedoch insbesondere bei größeren Polycythaemiegruppen. Ziel der vorliegenden Mitteilung ist es, die Beziehung zwischen BV, EM und peripherem Hämatokrit zu definieren und zur Frage Stellung zu nehmen, ob diese Isotopenuntersuchungen den üblichen Methoden in der Abgrenzung des Schweregrades einer Polycythaemia – behandelt oder unbehandelt – bzw. einer Polyglobulie überlegen sind. Schließlich sollte untersucht werden, ob die Bestimmung von BV und EM in der Differentialdiagnose Polycythaemia vera und sekundäre Polyglobulie verwendet werden kann.

Material und Methode

Polycythaemia vera. Die Gruppe umfaßt 73 Patienten mit Polycythaemia vera. Die Diagnose wurde aus dem peripheren Blutbild, einer Knochenmarkspunktion bzw. Knochenbiopsie, dem Ausschluß einer zur Polyglobulie führenden pulmonalen und ein

---

Die Untersuchung wurde teilweise durch ein Fellowship der Internationalen Atomic Energy Agency, Wien, ermöglicht.

dialen Erkrankung sowie in manchen Fällen durch die Bestimmung der Sauerstoffsättigung des peripheren Blutes gestellt. Patienten mit stärkerer Milzvergrößerung (unterer Milzpol mehr als 10 cm unter dem Rippenbogen), wurden von dieser Gruppe ausgeschlossen, einerseits weil es sich in diesen Fällen, wie Knochenbiopsien zeigten, meist um Übergangsstadien zur Myelofibrose handelt, andererseits weil Splenomegalien – wie an anderer Stelle angeführt (14) zu charakteristischen Blutvolumenveränderungen führen und so die Homogenität der Gruppe stören könnte.

Polycythaemia vera im Remissionsstadium nach ^{32}P*-Behandlung*. Die Gruppe umfaßt 16 Patienten mit sekundärer Polyglobulie als Folge chronischer pulmonaler Erkrankungen, gewöhnlich ohne gleichzeitige cardiale Dekompensation.

Vergleichsgruppe. Um die Beziehung zwischen Hämatokrit, Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM) und Blutvolumen (BV) über einen weiten Bereich vergleichen zu können, wurden den Patienten mit Polycythaemie bzw. Polyglobulie eine Vergleichsgruppe anämischer und hämatologisch normaler Personen gegenüber gestellt. Es handelt sich um 85 Patienten (48 Männer, 37 Frauen) mit Anämien verschiedener Ursache und Schwere, die keine stärkere Milzvergrößerung zeigten, und 40 Personen ohne hämatologische Erkrankungen (21 Männer, 19 Frauen). Patienten mit chronischen Leber- und Nierenerkrankungen, solche unter hochdosierter Steroidtherapie, Schwangere und Patienten mit primär-chronischer Polyarthritis wurden von der Vergleichsgruppe ausgeschlossen. Es handelte sich um Patienten mit kongenitaler hämolytischer Anämie (14), erworbener hämolytischer Anämie (21), aplastischer Anämie (21), Eisenmangelanämie (19), Leukämien (5) und symptomatischen Anämien anderer Ursache (5). Bei den 40 Personen ohne Anämie (Hämatokrit 40 bis 54%), im weiteren als «Kontrollgruppe» bezeichnet, um 7 gesunde Freiwillige und um Patienten mit verschiedenen internen und chirurgischen Erkrankungen inkl. 14 Patienten mit lokalisierten Tumoren, jedoch ohne Hinweis auf hämatologische Erkrankungen. Über diese Vergleichsgruppe wurde an anderer Stelle ausführlich berichtet (14).

Bestimmung der Gesamtmenge der Erythrozyten (EM). Die patienteneigenen Erythrozyten wurden mit etwa 30–100 μC ^{51}Cr hoher spezifischer Aktivität (Radiochemical Centre Amersham) als Na_2CrO_4 nach der in unseren Laboratorien üblichen Standardmethode markiert (15). 15–20 Minuten nach der Injektion der chrommarkierten Erythrozyten wurden mindestens ein, meist zwei Blutproben entnommen. Jeweils 3 ml der Blutprobe und des Standards wurden in einem Bohrlochkristall gemessen und mindestens 10^4 Impulse pro Probe gezählt, der Zählfehler lag also innerhalb $\pm 2\%$. Die Normalwerte der EM, bezogen auf das Körpergewicht, betrugen in der Kontrollgruppe (40 Personen) 27,18 ml/kg mit einer Standardabweichung von $\pm 4{,}11$ ml/kg.

Bestimmung des Blutvolumens (BV). Das BV wurde aus der EM und dem Körperhämatokrit errechnet. Der Körperhämatokrit ist nach CHAPLIN et al. (16) durch den peripheren Hämatokrit mal einem Korrekturfaktor gegeben (0,91), der über einen weiten Hämatokritbereich konstant ist. Die Normalwerte des BV betrugen in der Kontrollgruppe (40 Personen) 67,63 ml/kg mit einer Standardabweichung von $\pm 7{,}16$ ml/kg.

Hämatokritbestimmung. Eine Mikrohämatokritmethode wurde verwendet, wobei 5 Minuten bei ca. 12.000 g zentrifugiert wurde. Auf eine Korrektur für «trapped plasma», da vernachlässigbar gering (17), wurde bei dieser Methode verzichtet.

Ergebnisse

Gesamtmenge zirkulierender Erythrozyten (EM)

Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Die EM betrug bei den Polycythämikern 55,5 ($\pm$ 9,2) ml/kg, bei den Polyglobuliepatienten 46,9 ($\pm$ 12,8) ml/kg. Er

wartungsgemäß war die EM der Polycythämiker im Mittel signifikant höher als der Polyglobuliepatienten (p <0,01)

Hämatokrit

Der Hämatokrit der Polycythämiker betrug im Durchschnitt 60,9% (± 6,4%) der Polyglobuliepatienten 59,1% (± 8,3%).

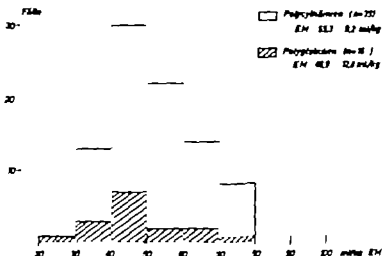


Abb. 1 Zirkulierende Erythrocytenmenge (EM) der Patientengruppen.

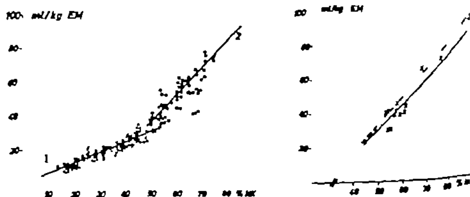


Abb. 2. Vergleich von Hämatokrit (HK) und Erythrocytenmenge (EM).
1 Vergleichsgruppe (●) EM = 0,598 HK + 0,71
2 Polycythaemia (o) EM = 1,568 HK — 42,46
3 Polyglobulie ( ) EM = 1,420 HK — 38,02

Vergleich von Erythrozytenmenge und Hämatokrit

1) Polycythaemia vera. Während in der Vergleichsgruppe (Hämatokrit 12–54%) eine ziemlich enge Beziehung zwischen EM und Hämatokrit bestand und Änderungen der EM durch den Hämatokrit hinreichend gut wiedergegeben wurden (Abb 2) war der Hämatokrit bei Polycythämikern ein weniger empfindlicher Index der EM. Einerseits streuten die Ergebnisse der beiden Bestimmungsmethoden stärker als in der Vergleichsgruppe ($p < 0\ 05$) Andererseits wurden Veränderungen der EM durch den Hämatokrit in der Polycythämikergruppe weniger empfindlich wiedergegeben als in der Vergleichsgruppe. Im Hämytokritbereich unter 50% führte eine Zunahme der EM von 6 0 ml/kg zu einem mittleren Hämatokritanstieg von 10% bei den Polycythämikern war jedoch eine Erhöhung der EM von 15 7 ml/kg zum gleichen Hämatokritanstieg notwendig Die Regressionskoeffizienten der beiden Gruppen unterscheiden sich daher auch hochsignifikant ($p < 0\ 001$ Polycythämiker $b = 1{,}57 \pm 0{,}16$ Vergleichsgruppe $0\ 66 \pm 0{,}03$)

2) Behandelte Polycythaemien. Bei allen 20 Patienten war der Hämatokrit nach ^{32}P Therapie auf Normalwerte abgefallen. Auch die EM lag nach der Behandlung bei 17 Patienten im Normalbereich. In den 3 Fällen mit weiterhin leicht erhöhter EM war das BV nicht auf Normalwerte abgefallen, wodurch die Diskrepanz zwischen erhöhter EM trotz normalisiertem Hämatokrit zustandekam (Abb. 3)

3) Sekundäre Polyglobulien. In der Patientengruppe mit sekundärer Polyglobulie entsprach einer Zunahme des Hämatokrites um 10% eine durchschnittliche Erhöhung der EM um 14,2 ml/kg Wie der Vergleich der Regressionsgeraden der Polycythämiker mit der der Polyglobuliepatienten zeigte (Abb 2) war bei gegebenem Hämatokrit die EM der Polycythämiker durchschnittlich etwas höher als die der Polyglobuliepatienten Im Einzelfall überschnitten sich allerdings die Ergebnisse der beiden Gruppen zu sehr als daß diese Bestimmung für die Differentialdiagnose Polycythaemie oder Polyglobulie geeignet wäre.

Blutvolumen (BV)

58 der 73 Polycythämiker und 9 der 16 Polyglobuliepatienten zeigten ein über den Normbereich erhöhtes BV (Abb 4) Im Mittel betrug es in der ersten Gruppe 94 7 ($\pm$ 17 7) ml/kg in der zweiten 83 8 ($\pm$ 15 1) ml/kg Die Erhöhung des BV war der Zunahme der

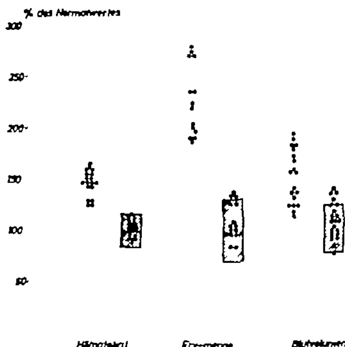


Abb 3. Haematokrit, Erythrocytenmenge und Blutvolumen bei Polycythaemiepatienten vor ( ) und nach (●) ^{32}P Behandlung. Normalbereich schraffiert.

EM korreliert (b = 0,90 bzw 0,97) Einer Zunahme der EM um 10 ml/kg entsprach eine mittlere BV Zunahme von 11,3 ml/kg bei den Polycythämikern und von 11,0 ml/kg bei den Polyglobulie patienten (Abb 5) Über das Ergebnis der BV Bestimmungen bei behandelten Polycythämikern siehe Abb 3

Diskussion

Da die konventionellen hämatologischen Untersuchungsmethoden zur Diagnose einer Polycythämie bzw Polyglobulie hinreichen ist eine Bestimmung von Blutvolumen (BV) und Gesamtmenge zirkulierender Erythrocyten (EM) klinisch wohl nur dann indiziert, wenn sich daraus bessere quantitative Aussagen über den Schweregrad einer Plethora machen lassen. Diskrepanzen zwischen klinischem Erscheinungsbild und Hämatokritanstieg bei Polycythaemia vera wurden in mehreren Arbeiten beschrieben (1 4 5, 6, 18) Sie ergeben sich auch aus einem Vergleich von EM und Hämatokrit. Bei 73 in diesem Rahmen untersuchten Polycythämi-

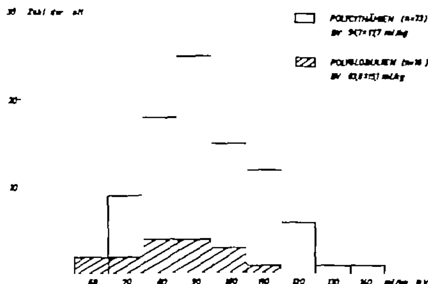


Abb. 4 Blutvolumen (BV) der Patientengruppen.

kern war die EM im Mittel auf das Doppelte, im Einzelfall bis auf das über Dreifache des Normwertes erhöht. Dagegen hatte der Hämatokrit im Mittel nur um die Hälfte zugenommen. Ein ähnliches Verhalten wurde bei 16 Polyglobuliepatienten beobachtet. Die geringere Empfindlichkeit des Hämatokrites findet wohl ihre Erklärung im Verhalten des BV bei dieser Erkrankung

In einer eigenen (14) sowie in anderen (8, 19) Arbeiten wurde ein – abgesehen von individuellen Variationen – konstantes BV über einem Hämatokritbereich von 20–50 / gefunden. Voraussetzung ist allerdings, daß man – wie in unserer Vergleichsgruppe – mögliche Verdünnungsanämien ausschließt, also Patienten mit ausgeprägter Splenomegalie (14 20 21 22) chronischen Leber 23) und Nierenerkrankungen (24 25) Schwangere (26) Patienten mit primär-chronischer Polyarthritis (27) und solche unter hohen Steroiddosen (28) Zwischen Hämatokrit und EM besteht dann, wie gezeigt werden konnte, eine ziemlich enge Beziehung (8, 14 19) Dagegen veränderten sich in unserer Polycythämikergruppe EM und BV gleichsinnig (Abb 4) Eine Zunahme der EM um 10 ml/kg war von einer durchschnittlichen Erhöhung des BV um 11,3 ml/kg begleitet. Es ist einleuchtend daß diese gleichsinnige Zunahme zu einem Empfindlichkeitsverlust der konventionellen hämatologi

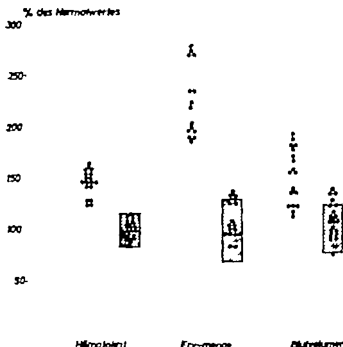


Abb. 3. Haematokrit, Erythrozytenmenge und Blutvolumen bei Polycythaemiepatienten vor ( ) und nach (●) ³²P-Behandlung. Normalbereich schraffiert.

EM korreliert (b = 0,90 bzw 0 97) Einer Zunahme der EM um 10 ml/kg entsprach eine mittlere BV Zunahme von 11,3 ml/kg bei den Polycythämikern und von 11 0 ml/kg bei den Polyglobuliepatienten (Abb 5) Über das Ergebnis der BV Bestimmungen bei behandelten Polycythämikern siehe Abb 3

Diskussion

Da die konventionellen hämatologischen Untersuchungsmethoden zur Diagnose einer Polycythämie bzw Polyglobulie hinreichen, ist eine Bestimmung von Blutvolumen (BV) und Gesamt menge zirkulierender Erythrozyten (EM) klinisch wohl nur dann indiziert, wenn sich daraus bessere quantitative Aussagen über den Schweregrad einer Plethora machen lassen. Diskrepanzen zwischen klinischem Erscheinungsbild und Hämatokritanstieg bei Polycythaemia vera wurden in mehreren Arbeiten beschrieben (1 4 5, 6 18) Sie ergeben sich auch aus einem Vergleich von EM und Hämatokrit. Bei 73 in diesem Rahmen untersuchten Polycythämi-

der brüskeren Aderlaßbehandlung auch bei weitgehendem Hämatokritabfall ausbleiben*. Einer Normalisierung des Hämatokrites entsprach auch in 17 der 20 Fälle eine Verminderung der EM auf Normalwerte, in den übrigen Fällen lag die EM gerade über dem Normbereich. Wir glauben daraus schließen zu können, daß die Bestimmung der EM bei Polycythämikern am Höhepunkt der Erkrankung angezeigt ist, die konventionellen Methoden zur Kontrolle des Therapieerfolges jedoch im Allgemeinen genügen.

Über die Veränderungen der EM im Vergleich zum Hämatokrit bei Polyglobuliepatienten liegen widersprechende Berichte vor. Mollison et al. (8) fanden bei Säuglingen mit einem Hämatokrit bis über 70% einen zunehmenden Empfindlichkeitsverlust des Hämatokrites, der unseren Ergebnissen vergleichbar ist. Dagegen beschrieb Verel (10) bei sekundären Polyglobulien als Folge kongenitaler Vitien im Verhalten von BV und EM Unterschiede gegenüber Polycythämiepatienten. Trotz erheblicher Zunahme der EM fehlten stärkere BV Zunahmen bei den von ihnen untersuchten Polyglobuliepatienten, fanden sich jedoch, hier in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, bei den Polycythämikern. Wir beobachteten dagegen eine gleichsinnige Zunahme von BV und EM auch bei unserer Gruppe pulmonal bedingter Polyglobulie. Bei gegebenen Hämatokrit war die EM der Polycythämiker im Durchschnitt vielleicht etwas höher als die der Polyglobuliepatienten, jedoch nicht genug um aus diesen Bestimmungen im Einzelfall die Differentialdiagnose Polycythaemia vera oder sekundäre Polyglobulie zu erlauben. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Berlin et al. (1). Die Patientengruppe mit sekundärer Polyglobulie war mit 16 Fällen allerdings ziemlich klein, und weitere Untersuchungen an einem größeren Material könnten von Interesse sein.

Es ginge über den Rahmen dieser Untersuchungen hinaus, Erklärungen für das unterschiedliche Verhalten des BV bei einem Hämatokrit von über und unter 50% zu finden. Während das Plasmavolumen bei Anämien Veränderungen der EM hinreichend kompensiert und dadurch im Allgemeinen ein konstantes BV aufrecht erhält (8, 14 19), fällt es bei erhöhter EM kaum unter den Normalwert ab, woraus die gleichsinnige Zunahme von BV und EM resultiert. Die klinische Konsequenz dieses Verhaltens ist allerdings, daß eine extreme Viskositätszunahme des Blutes verhindert

---

* Unveröffentlichte Beobachtung.

wird, im Plasma zirkulierende Substanzen in ihrer Gesamtmenge nicht stärker abnehmen und letztlich die Notwendigkeit, exaktere Vorstellungen über das Ausmaß einer Erythrozytenvermehrung nicht durch Konzentrationsmessungen, sondern durch Isotopenmethoden, die auf dem Verdünnungsprinzip beruhen, zu erhalten.

Zusammenfassung

Nach Markierung der Patientenerythrozyten mit ^{51}Cr wurde zirkulierende Erythrozytenmenge (EM) und Blutvolumen (BV) bei 73 Patienten mit Polycythaemia vera (in 20 Fällen auch nach erfolgreicher ^{32}P Therapie) und bei 16 Patienten mit sekundärer Polyglobulie bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit der Hämatokritbestimmung verglichen, woraus sich folgende Schlußfolgerungen ergeben 1. Die Hämatokritbestimmung ist bei Polycythaemia vera und sekundärer Polyglobulie ein wenig empfindlicher Index des Schweregrades dieser Erkrankungen. 2. Die geringe Empfindlichkeit dieser auf Konzentrationsänderungen beruhenden Methode ist durch die gleichsinnige Zunahme von EM und BV bedingt. Bei einem Hämatokrit unter 50% ergeben beide Methoden unter bestimmten Voraussetzungen gut vergleichbare *Resultate;* 3. *Die* Isotopenmethode ist zur Feststellung des Schweregrades eine Plethora indiziert. Eine Differentialdiagnose Polycythaemia vera oder sekundäre Polyglobulie ist damit nicht möglich. Zur Kontrolle des Therapieerfolges mit ^{32}P genügen konventionelle hämatologische Methoden.

Summary

The number of circulating erythrocytes and the blood volume were determined in 73 patients with polycythaemia vera (including 20 cases successfully treated with ^{32}P) and 16 patients with secondary polycythaemia, after the patients red cells had been labelled with ^{51}Cr. The results were compared with haematocrit determinations, and the following conclusions drawn 1. haematocrit is less sensitive indication of the degree of severity of polycythaemia vera and secondary polycythaemia. 2. the relative insensitivity of these methods depending on changes in concentration is due to the parallel increase in blood volume and red cell count. With haematocrit levels below 50%, both methods give comparable results under certain circumstances. 3. the isotope method is indicated for determining the severity of polycythaemia. Differentiation between polycythaemia vera and secondary polycythaemia is not possible by this means. Conventional haematological methods are sufficient to confirm the results of radiophosphorus therapy

Résumé

Chez 73 malades atteints de la maladie d'Osler Vaquez (dans 20 cas également après une thérapie efficace au ^{32}P) et chez 16 malades ayant une polyglobulie secondaire, la masse des érythrocytes en circulation et le volume sanguin ont été déterminés à l'aide du marquage des érythrocytes au ^{51}Cr. Les résultats ont été comparés aux déterminations de l'hématocrite. Les conclusions suivantes peuvent être tirées 1. Pour la maladie d'Osler Vaquez et la polyglobulie secondaire l'hématocrite est un index peu sensible de la gravité de ces maladies. 2. La faible sensibilité de cette méthode mesurant des changements de concentration est déterminée par l'augmentation concomitante de la masse d'érythrocytes et du volume sanguin. A un hématocrite de 50%, les deux méthodes livrent dans certaines conditions des résultats comparables. 3. La méthode des

isotopes est indiquée pour la détermination du degré de pléthore. Elle ne permet pas la différentiation entre la maladie d'Osler-Vaquez et une polyglobulie secondaire. Pour les contrôles des résultats de la thérapie au ^{32}P les méthodes hématologiques conventionnelles suffisent.

Literatur

1. Berlin, N. I.; Lawrence, J. H. and Gartland, J. Blood volume in polycythemia as determined by P^{32} labelled red blood cells. Amer. J. Med. *9*: 747 (1950).
2. Stroebel, C. F., Hall, B. E. and Pease, G. L. Evaluation of radiophosphorus therapy in primary polycythemia. J. amer. med. Ass. *146*: 1301 (1951).
3. [illegible], H. The total amount of haemoglobin and the blood volume in polycythemia vera treated with radiophosphorus. Acta med. scand. *150*: 199 (1954).
4. Szur, L., Lewis, S. M. and Goolden, A. W. Polycythemia vera and its treatment with radioactive phosphorus. Quart. J. Med., N. S. *28*: 397 (1959).
5. [illegible], C. A. Increase in cell volume and pulmonary changes in polycythemia vera. Acta med. scand. *170*: 443 (1961).
6. [illegible], T. Die Rolle der Blutvolumenzunahme bei Polycythaemia vera und ihre Veränderung bei Behandlung mit P^{32}. Z. ges. inn. Med. *16*: 1048–1052 (1961).
7. Villanueva-Meyer, Röhler, H. und Horst, W. Kontrolle der Erythropoese: Ferrokinetik und ^{32}P Therapie bei Polycythaemia. Freiburger Symp. über Radioisotope in der Hämatologie, Freiburg 1.–3. III. 1962.
8. Mollison, P. L.; Veall, N. and Cutbush, M. Red cell and plasma volume in newborn infants. Arch. Dis. Childh. *25*: 242 (1950).
9. Eisenberg, S. The effect of congestive heart failure on blood volume as determined by radiochromium tagged red cells. *10*: 902 (1954).
10. Verel, D. Blood volume changes in cyanotic congenital heart disease and polycythemia vera. Circulation *23*: 749 (1961).
11. Shaw, D. B. and Simpson, T. Polycythaemia in emphysema. Quart. J. Medicine, N. S. *30*: 135 (1961).
12. Schreiner, S. S. Blood volume and heart disease. Progr. cardiovasc. Dis. *4*: 563 (1962).
13. Freedman, B. J. and Penington, D. G. Erythrocytosis in Emphysema. Brit. J. Haemat. *9*: 425 (1963).
14. Huber, H., Lewis, S. and Szur, L. The influence of anaemia, polycythaemia and splenomegaly on the relationship between venous haematocrit and red-cell volume. Brit. J. Haemat. *10*: 567 (1964).
15. Dacie, J. V. and Lewis, S. M. Practical Haematology 3rd ed. (Churchill, London 1963).
16. Chaplin, H.; Mollison, P. L. and Vetter, H. The body/venous haematocrit ratio: its constancy over a wide haematocrit range. J. clin. Invest. *32*: 1309 (1953).
17. Garby, L. and Vuille, J. C. The amount of trapped plasma in a high speed micro-capillary haematocrit centrifuge. Scand. J. clin. Lab. Invest. *13*: 642 (1961).
18. Linke, A. Herz und Kreislauf bei Erkrankungen des Blutes und der blutbildenden Organe. Handbuch der Inneren Medizin, Band IX/9 (Berlin 1960).
19. Klepzig, H. und Schachmann, W. Zur Regulation des Blutvolumens bei Anämien. Dtsch. Arch. klin. Med. *201*: 266 (1954).
20. McFadzean, A. J. S., Todd, D. and Tsang, K. C. Observations in the anemia of cryptogenetic splenomegaly. Blood *13*: 513 (1958).
21. Bowdler, A. J. Dilution anemia corrected by splenectomy in Gaucher's disease. Ann. intern. Med. *58*: 664 (1963).

22. Huber, H., Lewis, S. M. und Szur, L. S. Anämie und Gesamtmenge zirkulierender Erythrocyten bei Osteomyelosklerosen. Klin. Wschr (im Druck).
23. Huber, H. und Shirakura, N. Untersuchungen zu den Blutbildveränderungen bei Leberzirrhosen. Blut 11 75 (1965)
24. Emmerman, S.: Blood volume in patients with acute glomerulonephritis as determined by radioactive chromium tagged red cells. Amer. J. Med. 27 241 (1957).
25. Verel, D. A., Turnbull, G. R.; Tudhope and Ross, J. H.: Anaemia in Bright's disease. Quart. J. Med., N. S. 28 491 (1955)
26. Verel, D.; Bury, J. D. and Hope, A.: Blood volume changes in pregnancy and the puerperium. Clin. Sci. 15. 1 (1956).
27. Read, H. Anaemia in rheumatoid arthritis. Canad. med. Ass. J 87 781 (1962).
28. Jager, B. V.; Brown, H. and Nickerson, N. Alterations in plasma proteins, plasma volume and volume of packed cells in patients receiving ACTH or cortisone. Amer J. Med. 16. 181 (1954)
29. Goolden, A. W. G., Gartside, J. M. and Szur, L.: Changes in interstitial fluid in polycythaemia vera. Clin. Sci. 23 441 (1962).

Adressen der Autoren: Dr. H. Huber, Med. Univ.-Klinik Innsbruck (Österreich); Drs. S. M. Lewis und L. Szur, Depts. of Haematology and Radiotherapy, Hammersmith Hospital, *London W 12* (England).

Libri

James W. Eichelberger Jr.: Laboratory Methods in Blood Coagulation. Hoeber Med. Div. Harper & Row Publishers, New York and London. 95 p. 1965. $ 2.95.

The author, coagulationist at the Walter Reed Army Medical Center in Washington, describes in this little booklet briefly but clearly the detailed techniques for the pertinent tests in question. The instructive book can be recommended for technicians in the clinical laboratory.

G. Rosenow, New York

Ivan Bernát: Ozaena, a Manifestation of Iron Deficiency. Akadémiai Kiadó, Budapest 1965. 116 S., Preis Forint 60.

Da chronischer Eisenmangel von atrophischen Schleimhautveränderungen begleitet sein kann, hat der Autor bei 65 Patienten mit Ozaena den Eisenhaushalt untersucht; 44 hatten eine Eisenmangelanämie und die übrigen einen latenten Eisenmangel. Die Behandlung der Ozaena mit Eisen war in den Händen des Autors erfolgreich. Im Tierexperiment führt chronischer Eisenmangel über zwei bis drei Generationen zu histologischen Nasenschleimhautveränderungen, wie sie bei Ozaena beobachtet werden. Es sei dem Leser überlassen, die pathogenetischen Überlegungen des Autors und die Schlüsselstellung des Eisens in der Entstehung der Ozaena selbst zu beurteilen.

P. Frick, Zürich

The Hemophilias. International Symposium Washington. Ed. K. M. Brinkhous. The University of North Carolina Press, Chapel Hill 1964, 412 p. $ 7.50.

The book which contains the somewhat extended proceedings of the Conference on Hemophilia in 1963, is an excellent review of the present concept of the hemophilias. The papers presented by a great number of participants are given and also the interesting discussions.

G. Rosenow, New York

Emmanuelle de Wolff: Etude clinique de 134 mongoliens. Supplementum ad 202 Vol., Annales Paediatrici, S. Karger A. G. Basel/New York 1964.

Die Monographie umfaßt eine sorgfältige klinische Studie derjenigen Mongoloiden, welche 1945–1961 an der Aargauer Kinderklinik zur Beobachtung kamen. Besondere Aufmerksamkeit wird den assoziierten Anomalien und Mißbildungen, dem Leukämieproblem sowie der Aetiologie gewidmet. Prognose und soziale Probleme der Krankheit werden kurz besprochen.

G. Stalder, Basel

XIth Congress of the International Society of Haematology

The XIth Congress of the International Society of Haematology will be held in Sydney Australia, from August 21st to 26th, 1966.

Scientific programme. The scientific sessions will be held at the University of Sydney. The morning sessions will consist of two simultaneous plenary meetings and the afternoon sessions will deal with wide range of topics in papers, symposia and round-table discussions. The following topics have been chosen for the plenary sessions: The lymphoid cell in health and disease; nutrition and anaemia; leukaemogenesis genetics red cell metabolism coagulation red cell production and destruction factors in thrombosis; leucocyte and platelet physiology haemoglobin structure.

Languages: Papers may be given in either English or French. There will be no simultaneous translations at this Congress. This is in accordance with the decision of the meeting of Councillors in Stockholm in 1964 However it is planned to have available for members of the Congress at the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given t the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to *the Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Haematology 1 York St., Sydney N.S.W Australia.*

XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion

The XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion will be held in Sydney Australia, from August 24th to 29th, 1966. The Congress will follow immediately after the XIth Congress of Haematology and joint Plenary Sessions have been arranged for Thursday August 25th, and Friday August 26th, 1966.

Scientific programme. It is planned to hold two plenary sessions each morning. The following subjects have been chosen for the plenary sessions, the first four being combined sessions with the Congress of the International Society of Haematology: Recent advances in blood genetics white cell and platelet physiology red cell metabolism structure of haemoglobin auto-immunity extra-corporeal circulation; organ transplantation plasma proteins. The afternoon sessions will be devoted to papers on selected subjects, e.g new aspects of blood and serum groups fractionation of blood plastics in blood transfusion automation in blood banks coagulation disorders immuno-haematology including haemolytic disease of the newborn; preservation of blood.

Languages: Papers may be given in either English or French. It is planned to have available for members of the Congress, t the time of their registration in Australia, printed copies in both English and French of the full text of all papers to be given at the plenary sessions.

All correspondence regarding the Congress should be addressed to *the Secretary-General, XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion, 1 York St., Sydney, N.S.W Australia.*

Acta haemat. 34 129–143 (1965)

Clinique Médicale Universitaire, Lausanne (Directeur: Prof. A. Vannotti)

Les phosphatases leucocytaires alcaline et acide: Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques

By Par J. A. Antonioli, A. Baer et A. Vannotti

En 1930 Umeno (36) et Kay (15) ont décrit l'existence dans le leucocyte de la phosphatase alcaline. Depuis lors, les variations d'activité de cette enzyme dans de multiples situations physiologiques ou pathologiques ont suscité de nombreuses recherches dont les résultats, en dépit de certaines contradictions, ont permis l'établissement de nombreux faits (43 25 16, 38, 39 40 41 42 3 44 45 46 30 31 13 14 20 21 32 33 17). La phosphatase alcaline n'existe chez les leucocytes que dans environ 25 % des granulocytes neutrophiles mûrs. L'activité de la phosphatase alcaline du neutrophile est abaissée dans certaines leucémies myéloïdes chroniques, dans la mononucléose infectieuse et dans l'hémoglobinurie nocturne paroxystique. Elle est augmentée lors d'infections, de stress, de carcinose, de cirrhose, de métaplasie myéloïde et de myélosclérose, de polycythémie vraie, de tumeurs et de fractures osseuses. Elle est augmentée également chez la femme lors de la deuxième et de la troisième semaine du cycle (5) et durant la grossesse (39 26 6). On a proposé le dosage en clinique de la phosphatase alcaline du neutrophile afin d'aider au classement des leucémies à monocytes (24), au diagnostic différentiel de la leucémie myéloïde chronique et des myéloses non leucémiques (42), au diagnostic différentiel de la polycythémie vraie et de la polyglobulie (40 22), au dépistage précoce des grossesses (12), au diagnostic du stade d'évolution du lymphogranulome malin (37).

Alter *et al.* (1) ont émis une hypothèse, dont certains points ont déjà été vérifiés, et qui permet de tenter une explication générale des modifications d'activité de la phosphatase alcaline du neutro-

phile. Cette enzyme serait normalement sous la dépendance de 2 gènes, localisés sur la 21e ou la 22e paire chromosomique. L'absence de ces gènes caractériserait une maladie héréditaire, l'hypophosphatasie, dans laquelle n'existe aucune activité de la phosphatase alcaline dans le granulocyte (4). La perte d'un gène pourrait être liée aux lésions chromosomiques de la 21e ou 22e paire relevées dans certaines leucémies myéloïdes chroniques et être la cause de l'activité phosphatasique abaissée décrite dans cette affection (23). L'existence de 3 gènes, suggérée par la trisomie de cette 21e ou 22e paire expliquerait l'augmentation de l'activité enzymatique dans le mongolisme (1). Au cours de la vie, l'activité enzymatique fondamentale du granulocyte, qui est sous l'étroite dépendance de sa structure génétique, peut être modulée, à l'intérieur de certaines limites, et par l'intermédiaire de mécanismes encore inconnus, par toute une série de facteurs, et plus particulièrement par des facteurs endocriniens. VALENTINE *et al.* (39) ont reproduit l'élévation de la phosphatase alcaline du neutrophile que l'on observe dans le stress en injectant de l'ACTH ou de l'hydrocortisone. BOREL *et al.* (5), en administrant de l'oestradiol, et CLINE *et al.*, (7) en administrant un progestérone de synthèse (ENOVID) ont provoqué une élévation de la phosphatase alcaline du neutrophile.

Même en admettant comme fondée cette tentative d'explication, il faut reconnaître que tous les facteurs humoraux de régulation du métabolisme leucocytaire n'ont pas été identifiés. De plus, comme la teneur en phosphatase alcaline augmente dans le granulocyte en cours de maturation, il faut tenir compte du fait qu'une libération massive par la moelle osseuse de neutrophiles jeunes, ou qu'une séquestration ou une libération de granulocytes mûrs par les tissus, peut modifier l'activité phosphatasique moyenne des granulocytes circulants (34, 35).

La phosphatase acide leucocytaire a été relativement peu étudiée. Elle a été décrite dans les neutrophiles d'exsudat de lapin (8) et dans les neutrophiles d'homme (27); selon HAIGHT *et al.* (11) ce serait surtout une enzyme lymphocytaire; selon BOREL *et al.* (5) elle serait presque deux fois plus active dans le polynucléaire que dans le lymphocyte. On trouve son activité abaissée dans la leucémie myéloïde aiguë et dans la leucémie lymphoïde chronique, alors qu'elle est normale dans la leucémie myéloïde chronique (38, 44, 30). Elle est inchangée dans la polycythémie vraie (45, 3); dans la

myélofibrose (44) dans le lymphosarcome (30, 3) dans le lymphogranulome malin, le myélome, la métaplasie leucémoïde, l'éosinophilie (3) WILLIAMS *et al.* (44) l'ont trouvée augmentée dans l'anémie réfractaire leucopénique et thrombocytopénique et KERPPOLLA (16) dans l'anémie achrestique. La phosphatase acide leucocytaire demeure inchangée lors de leucocytoses infectieuses (38, 44) lors d'hémoglobinurie nocturne paroxystique (3) et lors de grossesse (26) Les cellules de Gaucher de la rate, dans la glycogénose, renferment une phosphatase acide très active (9)

Nous avons entrepris un travail de sondage clinique afin de poursuivre l'étude des facteurs humoraux qui règlent l'activité de la phosphatase alcaline leucocytaire. Nous voulons également connaître le comportement de la phosphatase acide en pathologie et voir si des modifications éventuelles de cette activité sont sous la dépendance des mêmes facteurs que celle de la phosphatase alcaline. Nous voulons de plus étudier la corrélation entre les phosphatases acide et alcaline du leucocyte et celles du plasma, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été fait systématiquement.

Matériel et méthodes

Chez 219 malades, choisis au hasard parmi les entrées à l'hôpital et classés selon le diagnostic clinique, on a dosé, selon la méthode biochimique de LOWRY (19) les phosphatases alcaline et acide dans les leucocytes isolés et homogénéisés (6) et dans le plasma. L'activité enzymatique est exprimée en μmol de p-nitro-phénol libérées par minute d'incubation à 37° par leucocyte (phosphatase acide) par granulocyte (phosphatase alcaline) ou par ml de plasma (phosphatases plasmatiques)

Les limites de l'activité normale sont tirées d'un collectif de 40 témoins pour les phosphatases leucocytaires et d'un collectif de 20 témoins pour les phosphatases plasmatiques (moyenne arithmétique $\pm$ 2 déviations standard) Phosphatase alcaline neutrophilique, homme 2,02–3,78 10^{-8} femme 0–11,33 10^{-8}; phosphatase acide, homme et femme 1,40–9,28 10^{-8}; phosphatase alcaline plasmatique, homme et femme 23,06–88,68 10^{-8} phosphatase acide plasmatique, homme et femme 0–22,76 10^{-8}

Notre sondage ne révèle aucun cas de valeur d'activité enzymatique nettement abaissée comme de plus chaque catégorie clinique ne renferme que peu de cas et que les augmentations d'activité mesurées sont souvent de grande amplitude, jusqu'à 10 fois la limite supérieure de la normale, nous avons renoncé à caractériser un groupe par son activité moyenne et nous nous contentons d'enregistrer des augmentations d'activité.

Résultats

Corrélation entre les augmentations observées L'examen des résultats globaux (tableau I) permet de constater que sur 219 malades, 155 ont au moins l'une des valeurs dosées augmentée. Il s'agit, le plus souvent, soit d'une augmentation isolée de la phosphatase al-

Tableau I

Résultats globaux.
Malades examinés 219.

Augmentation d'au moins l'une des valeurs testées	155 cas	(70,8%)
Augmentation de la phosphatase alcaline neutrophilique:	93 cas	(42,5%)
Augmentation de la phosphatase acide leucocytaire	74 cas	(33,8%)
Augmentation de la phosphatase alcaline plasmatique	57 cas	(26,0%)
Augmentation de la phosphatase acide plasmatique	31 cas	(14,2%)

Combinaisons des augmentations observées:

Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
	Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
29	+	n	n	n
26	+	+		n
21	n	+		
16	+	n	+	n
14	n	n	+	n
9	n	+	+	n
9	+	+		
6	n	n	n	+
7	+	n		+
5	n	n	+	+
5	n	+	n	+
5	+	+	+	+
2	+	n	+	+
1	+	+	n	+
0	n	+	+	+
64	n	n	n	n
219				

Ph. alc. = phosphatase alcaline; ph. ac. = phosphatase acide.
Activité normale = n activité augmentée = +

caline leucocytaire, soit d une augmentation simultanée phos-phatases alcaline et acide leucocytaires, soit encore d une au-tation isolée de la phosphatase acide leucocytaire.

Si ces quatre activités enzymatiques variaient indépe-ment l'une de l autre, la probabilité d apparition simultan deux valeurs augmentées serait égale au produit des prob d apparition de chacune d entre elles. Or les probabilités d ap tion d augmentation simultanée de deux valeurs d activité matique prises deux à deux telles qu on les calcule à partir des babilités observées d apparition isolée et telles qu on les enreg effectivement sont très voisines l'une de l'autre (tableau II) Auc corrélation n apparaît donc entre ces quatre caractères.

Tableau II

Corrélations entre les augmentations d'activités enzymatiques observées.

P = probabilité de l'apparition d'une augmentation de l'activité enzymatique. A = phosphatase alcaline neutrophillique; B = phosphatase acide leucocytaire. C = phosphatase alcaline plasmatique. D = phosphatase acide plasmatique.

Probabilité d'apparition, calculée en considérant les 2 caractères envisagés comme indépendants l'un de l'autre	Probabilité d'apparition observée dans le collectif étudié
P(A) P(B) = 0,144	P(AB) = 0,178
P(A) P(C) = 0,110	P(AC) = 0,157
P(A) P(D) = 0,060	P(AD) = 0,059
P(B) P(C) = 0,068	P(BC) = 0,096
P(B) P(D) = 0,048	P(BD) = 0,041
P(C) P(D) = 0,037	P(CD) = 0,046

En classant les valeurs augmentées par catégorie clinique (tableau III) on retrouve dans chaque groupe une fréquence des augmentations qui ressemble fort à celle observée dans le tableau I. L'augmentation la plus fréquemment observée est celle de la seule phosphatase alcaline leucocytaire ou éventuellement l'augmentation simultanée des phosphatases alcaline et acide leucocytaires. On observe donc des variations des deux phosphatases leucocytaires dans les mêmes circonstances pathologiques.

Variations des phosphatases plasmatiques (tableau III et IV). Le 26% des patients examinés présente une activité accrue de la phosphatase alcaline plasmatique. Ces augmentations s'observent dans les maladies du foie (ictère, cirrhose, troubles circulatoires, intoxications), dans les infections, lors de néoplasie (du poumon ou de l'estomac), d'infarctus du myocarde ou du poumon, du lymphogranulome malin. On en voit également dans des cas isolés d'affections digestives, de diabète, d'urémie, d'affections thyroïdiennes, d'anémie. Il s'agit alors souvent de patients atteints en même temps d'autres maladies ou l'on note une hyperphosphatasémie.

La phosphatase acide plasmatique est augmentée dans le 14,2% de nos patients et selon une répartition clinique assez diverse: maladies du coeur et de la circulation, infections, maladies neurologiques, emphysèmes, maladies digestives, diabètes, maladies du foie. Aucun carcinome de la prostate avéré ne figure dans notre population.

Tableau III
Résultats par maladies.

Diagnostic	Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
		Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
Insuffisance cardiaque,	7	+	n	n	
hypertension, infarctus,	7	+	+	n	
ictus, artériosclérose	3	+	n	+	
	3	+	n	n	+
	2	+	+	+	
	1	+	+	+	+
	4	n	+	n	
	2	n	+	+	
	5	n	n	+	
	3	n	n	n	+
Maladies infectieuses	9	+	n	n	n
(phlébite, rhumatisme	6	+	+	n	
articulaire aigu,	5	+	+	+	
bronchopneumonie,	2	+	n	+	
glomérulonéphrite)	2	+	n	n	+
	1	+	+	n	+
	1	+	+	+	+
	5	n	+	n	
	2	n	+	n	+
	2	n	+	+	
	3	n	n	+	
	2	n	n	+	+
	1	n	n		+
Néoplasme pulmonaire	1	+	n	+	n
Néoplasme digestif	1	+	+	+	
	1	+	+	n	n
	1	n	+	n	n
Maladies pulmonaires	4	+	n	n	n
(emphysème, asthme	3	+	+	n	n
et infarctus)	2	+	n	+	n
	1	+	+	+	n
	1	+	n	+	+
	1	+	n	n	+
	2	n	+	n	n
	1	n	+	n	+
	4	n	+	+	n
	3	n	n	+	n
	1	n	n	n	+
Maladies digestives	3	+	n		
(gastrite, ulcère,	3	+	+	n	
iléite, troubles	1	+	n	n	+
fonctionnels)	2	n	+	n	
	2	n	+	n	+
	1	n	+	+	
	1	n	n	+	+

Tableau III (suite)

Diagnostic	Nombre de cas	Leucocytes		Plasma	
		Ph. alc.	Ph. ac.	Ph. alc.	Ph. ac.
Maladies hépatiques	1	+	n	n	n
(ictère, cirrhose,	2	+	+	n	n
troubles vésiculaires)	2	+	+	+	n
	5	+	n	+	n
	1		+	n	+
	1	n	+	+	n
	1	n	+	n	n
	1	n	n	+	+
Maladies rénales	1	+	+	n	n
(sclérose, urémie,	1	+	n	+	n
ptose, néphrose)	2	n	+	n	n
Ostéoporose	1	+	+		n
Cushing	1	+		n	n
Intoxications (alcool,	2	+	+	n	
CO somnifères)	1	+	+	+	+
	1	+	n	+	+
	1	+	n	+	n
	2	n	n	n	+
Maladies neurologiques,	1	+	+	n	n
affections psychiatriques	2	+	n	+	+
	1	+	n		+
	1	+	n	+	+
	1	n	+	n	n
	2	n	n	+	n
	1	n	n	n	+
Maladies du sang	5	+		n	n
	1	+	+		n
	4	n	+	n	n
	1	+	n	+	
	2	n	+	+	n
	1	n	n	+	
Diabète, obésité	1	+	n	n	n
	1	+	+	+	
	1	+	n	+	+
	3		+		
	2			+	
Thyroïde (goitre,	2	+	n	+	
dysthyroïdie, Basedow)	1	+	+	n	
	1	+	n		

Tous les malades de ces deux groupes figurent déjà dans d'autres rubriques.

Abréviations cf. tabl. I.

Variations des phosphatases leucocytaires (tableau III et IV) Les augmentations des phosphatases leucocytaires sont fréquentes (42,5 / des patients présentent une augmentation de la phosphatase alcaline et 33 8 / une augmentation de la phosphatase acide) elles surviennent dans de multiples circonstances cliniques, qui sont les mêmes pour les phosphatases alcalines et pour les phosphatases acides.

Discussion

Absence de corrélations entre les activités phosphatasiques mesurées: Dans la population étudiée, les quatre activités enzymatiques mesurées varient indépendamment les unes des autres. Il ne semble donc pas, contrairement à ce que pensaient Fiessinger *et al.* (10) que les leucocytes puisent dans le plasma une part appréciable de leurs phosphatases. Kerppolla (16) avait pressenti cette indépendance, mais en se basant sur un collectif qui ne comportait que peu de valeurs sériques augmentées et à l aide de techniques histochimiques qui ne décelaient à l état normal aucune phosphatase dans le granulocyte. Sirola *et al.* (31) avaient remarqué que les augmentations de la phosphatase alcaline granulocytaire survenaient fréquemment chez des patients chez lesquels cette enzyme restait dans des limites normales dans le sérum.

Augmentation des phosphatases plasmatiques Les augmentations de la phosphatase alcaline surviennent le plus souvent chez des malades souffrant d atteinte hépatique (ictère, cirrhose, stase veineuse, intoxications) d infections, de néoplasme (du poumon ou de l estomac) d infarctus cardiaque ou pulmonaire, de maladie de Hodgkin, ce qui est conforme aux données de la littérature. On peut admettre avec Richterich (28) que de telles augmentations sont le plus souvent le signe d une atteinte du parenchyme hépatique ou d une nécrose au sein d'un organe riche en phosphatase alcaline. *L observation d un taux enzymatique élevé* dans les «maladies digestives» peut faire soupçonner la présence de troubles hépatiques concomitants. L'hyperphosphatasémie relevée dans un cas d urémie est-elle due à la libération d enzyme par un rein lésé?

Parmi la population examinée, le 26 / des patients présentait une activité phosphatasique alcaline accrue dans le plasma. Ce pourcentage correspond à celui que trouvent Babson *et al.* (2) (environ 30 / d augmentation) qui a testé 2000 malades afin de détecter les cas d'hyperphosphatasémie.

Tableau IV
Résultats dans les maladies du sang

Diagnostic	Nombre de cas	Leucocytes Ph. alc.	Leucocytes Ph. ac.	Plasma Ph. alc.	Plasma Ph. ac.
Anémie de Biermer	1	+	+	n	n
	1	n	+	n	
Anémie hypochrome	1	+		+	n
	1	n	+	n	n
Hodgkin	2	+		n	
	1	n	+	+	n
	1			+	n
Tumeur lymphatique réticulaire	1		+	n	
Lymphosarcome	1	n	+	n	n
Réticulosarcome	1	+	n		
Plasmocytome	1		+	+	
	1	+	n	n	
Myélome	1	+	n	n	

Abréviations cf. tabl. I.

Tableau V
Cas Sch., homme 59 ans, entré en clinique dans un état de coma respiratoire

Date	Evolution de l'acidose respiratoire		Leucocytes Ph. alc.	Leucocytes Ph. acide	Plasma Ph. alc.	Plasma Ph. acide
4.12	Saturation	90%				
	pH sanguin	7,16				
	pCO	105 mm Hg				
5.12	Saturation	88%				
	pH sanguin	7 19	370,22	126,34	75,67	21,82
	pCO_2	103 mm Hg				
8.12			135,00	14,02	—	—
12.12	Saturation	83%				
	pH sanguin	7,35				
	pCO	63 mm Hg				
17 12			4,67	5,80	69,56	4,49
18.12	pH sanguin	7,34				
	pCO	59 mm Hg				
23.2.			5,62	1,68	52,17	13,92
23.2	pH sanguin	7 44				
	pCO	46 mm Hg				

Les phosphatases leucocytaires sont exprimées en 10^{-9} µmol/cellule/min; les phosphatases plasmatiques sont exprimées en 10^{-3} µmol/ml/min.

On peut distinguer dans le plasma en tout cas deux types de phosphatases acides, celle dont l'activité est inhibable par l'acide l ± tartrique dont l'origine est prostatique, et celle que n'inhibe point l'acide tartrique, qui provient de divers organes, entre autres, des érythrocytes. L'intérêt diagnostique du dosage de la phosphatase acide dans le sérum consiste dans l'étude de la fraction prostatique de cette enzyme dont l'augmentation permet de dépister précocement un carcinome de la prostate (29).

Notre collectif ne contient pas de néoplasme prostatique avéré et nous n'avons envisagé que les augmentations de l'activité enzymatique totale à pH 5. Le foie joue probablement un rôle dans les augmentations d'activité lors d'intoxications, (sédatifs) d'insuffisance cardiaque, surtout lorsqu'on observe simultanément une élévation de la phosphatase alcaline. ROSENMUND (29) publie une statistique de 49 cas d'augmentation de la phosphatase acide sérique. 25 de ces augmentations se voient chez des sujets non porteurs d'un carcinome de la prostate et parmi eux 11 sont des patients atteints de troubles hépatiques ou vésiculaires.

Augmentations de la phosphatase alcaline du neutrophile. L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline neutrophilique est fréquente. Elle se rencontre, conformément aux données de la littérature, lors d'infection, d'infarctus du poumon ou du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux, de cirrhose, de néoplasie. Mais nous l'avons également observée lors d'insuffisance cardiaque ou respiratoire, lors d'ictère ou d'hépatite, lors d'atteinte rénale (sclérose ou urémie), lors d'intoxication (alcool, CO, somnifères), lors d'affections neurologiques ou psychiatriques mal définies, dans quelques cas isolés de diabètes ou de troubles thyroïdiens.

Notre collectif ne renferme que peu de cas de maladies hématologiques. Dans deux cas d'anémie de Biermer, on relève une fois une valeur augmentée et une fois une valeur normale; dans cette maladie on a rapporté des valeurs normales (21), abaissées (32) ou élevées (25). Dans deux cas d'anémie hypochrome nous trouvons également une valeur augmentée et une valeur normale; pour MERKER *et al.* (21) on y trouve des valeurs élevées, pour SIROLA *et al.* (31) des valeurs abaissées. Lors de lymphogranulome malin, nous observons deux cas avec des valeurs augmentées et deux cas avec des valeurs normales. HAYOZ *et al.* (14), KERPPOLLA (16), SIROLA *et al.* (31), MERKER *et al.* (21) trouvent dans cette affection

des valeurs élevées, tandis que BECK *et al.* (3) n y rencontrent que des valeurs normales BOREL *et al.* (5) relèvent des valeurs normales en période de rémission et des valeurs augmentées lors de poussées hodgkiniennes. Alors que l on décrit habituellement des phosphatases alcalines neutrophiliques normales (14 3) ou abaissées (30) dans les réticulosarcomes et les lymphosarcomes, nous observons un réticulosarcome et un plasmocytome avec une activité enzymatique accrue. Un cas de myélome présente une valeur phosphatasique augmentée, conformément aux observations de PLUM (25) SIROLA *et al.* (31) et de KERPPOLLA (16) alors que BECK *et al.* (3) n'y trouvent que des valeurs normales.

Le rôle de la surrénale peut être évoqué pour expliquer une bonne partie des augmentations de la phosphatase alcaline du neutrophile. Ce rôle existe certainement dans l'infection et dans les situations aigües de stress. Lors de l'insuffisance hépatique, on peut invoquer un état d'hypercorticisme concomitant. Bien que l'on ignore encore le rôle fonctionnel exact de la phosphatase alcaline dans le métabolisme du leucocyte, on peut s attendre à trouver une action importante de la cortisone sur ce métabolisme d une cellule dont le rôle dans l'inflammation est primordial.

Les augmentations, souvent spectaculaires et dont le tableau V donne un exemple, pourraient être déclanchées par la baisse du pH sanguin. On expliquerait ainsi l élévation observée par LAMBERS (18) dans le coma diabétique et par WILTSHAW *et al* (46) dans les leucocytes incubés dans leur propre sérum ou dans une solution isotonique dans ce dernier cas, la glycolyse leucocytaire acidifierait le milieu.

Augmentation de la phosphatase acide du leucocyte On admet généralement que la phosphatase acide du leucocyte ne varie guère dans les maladies autres que les affections hématologiques et même dans ce dernier groupe on n a observé des activités accrues que dans certaines anémies (44 16) Notre sondage révèle au contraire que de telles augmentations sont fréquentes, qu elles sont tout aussi peu liées à une *entité clinique* donnée que celles de la phosphatase alcaline du neutrophile et qu elles s'observent, en gros, dans les mêmes affections que celles de cette dernière enzyme. La régulation de la phosphatase acide du leucocyte semble donc obéir à des mécanismes généraux, probablement humoraux, analogues à ceux dont dépend la phosphatase alcaline du neutrophile, mais dont on ne peut encore préciser l'identité.

Résumé

On dosé biochimiquement l'activité des phosphatases alcaline et acide dans les leucocytes et dans le plasma de 219 malades différents. Les phosphatases alcaline et acide, leucocytaires et plasmatiques, varient indépendamment les unes des autres. Les augmentations d'activité de la phosphatase alcaline du neutrophile sont fréquentes; elles s'observent en général lors d'infection, d'infarctus du poumon ou du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux de cirrhose, de néoplasme, et notamment dans la phase aigüe du lymphogranulome malin mais elles surviennent également lors d'insuffisance cardiaque ou respiratoire, lors d'ictère ou d'hépatite, lors d'intoxication, lors d'atteinte rénale, lors d'affections neurologique ou psychiatrique mal définies. La fréquence et l'importance des augmentations rencontrées dans l'insuffisance respiratoire font penser que l'on peut ranger l'acidose aux côtés des autres facteurs humoraux et endocriniens, actions de la surrénale et de l'ovaire, dont dépend la régulation de l'activité de cette enzyme. La phosphatase acide leucocytaire est également fréquemment augmentée ces augmentations observent dans les mêmes circonstances cliniques que celles de la phosphatase alcaline du neutrophile.

Summary

By biochemical methods, the activity of alkaline phosphatase and of acid phosphatase has been measured in the leucocytes and the plasma of 219 patients. The variation in enzymatic activity in all four cases is mutually independent. Increased alkaline phosphatase activity in the neutrophile is of frequent occurence; it occurs in cases of infection, pulmonary or myocardial infarction, cerebral vascular disturbances, cirrhosis, malignant tumor and in acute phases of malignant lymphogranuloma. Furthermore, increases have been noted in cardia and respiratory insufficiency in jaundice and hepatitis, in renal failure, in poisoning, in ill-defined neurological and psychiatric diseases. The frequency and level of such augmentations in respiratory insufficiency have led us to believe that the activity of this enzyme is conditioned by acidosis, as well as by humoral and endocrine factors, especially by adrenal and ovarian hormones. The level of acid phosphatase in the leucocyte is also often increased such increases occur in similar clinical conditions that give rise to augmentations of the alkaline phosphatase in the neutrophile.

Zusammenfassung

Bei 219 verschiedenen Patienten wurde die Aktivität der sauren und der alkalischen Phosphatase in den Leukozyten und im Plasma gemessen. Die Veränderungen der verschiedenen Phosphatasen in den Leukozyten und im Plasma sind voneinander unabhängig. Aktivitätssteigerungen der alkalischen Phosphatase im neutrophilen Leukozyten sind häufig Sie finden sich bei Infektionskrankheiten, Lungen- und Herzinfarkt, cerebralen Zirkulationsstörungen, Lebercirrhose und Tumoren, besonders beim akuten Lymphogranulom. Außerdem ist die Aktivität erhöht bei cardialer oder respiratorischer Insuffizienz, Ikterus oder Hepatitis, Vergiftungen, Nierenkrankheiten, und bei unklaren neurologischen und psychiatrischen Affektionen. Die Häufigkeit und das Ausmaß der Erhöhungen bei respiratorischer Insuffizienz sprechen dafür daß neben humoralen und endokrinen Faktoren (Nebennierenrinde und Ovar) die Blutacidose bei der Regulation der Aktivität dieser Enzyme eine Rolle spielt. Auch die saure Leukozyten-Phosphatase ist oft erhöht, und zwar bei den gleichen klinischen Zuständen wie die alkalische.

Bibliographie

1. Alter, A. A.; Lee, S. L.; Pourfar, M. and Dobkin, G. Studies of leukocyte alkaline phosphatase in mongolism possible chromosome marker Blood 22: 165–177 (1963).
2. Babson, A. L. Read, P A.; Phillips, G. E. and Luddecke, H. F Use of new assay in study of serum alkaline phosphatase levels in 2000 hospital patients. Clin. Chem. 6. 495–500 (1960).
3. Beck, W S. and Valentine, W N. Biochemical studies on leucocyte. II. Phosphatase activity in chronic lymphatic leukemia, acute leukemia and miscellaneous haematologic conditions. J Lab. clin. Med. 38. 245–253 (1951).
4. Beisel, W R. Benjamin, N and Austen, K. F Absence of leucocyte alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia. Blood 14 975–977 (1959)
5. Borel, C. Frei, J et Vannotti, A. Etude enzymatique directe au niveau du leucocyte. Helv physiol. Acta 16. C53–C55 (1958).
6. Borel, C. Frei, J and Vannotti, A. Leucocyte metabolism in pregnancy Acta endocrin. 35. 575–584 (1960).
7 Climie, A. R. W Heinrichs, W L. and Foster, J J Neutrophilic alkaline phosphatase test; review with emphasis on findings in pregnancy Amer J clin. Path. 38: 95–103 (1962)
8. Cram, D. M. and Rossiter, R. J Phosphatase of rabbit polymorphonuclear leucocytes. Canad. J Res. E26–27 290–307 (1948–49).
9. Crocker, A. C. and Landing, B. J Phosphatase studies in Gaucher's disease. Metabol. clin. Exp. 9: 341 362 (1960).
10. Fiessinger, N. et Boyer, F Les phosphatases des leucocytes. Enzymologia 1 172 176 (1936).
11. Haight W F and Rossiter, J R. Acid and alkaline phosphatase in white cells. Data for the lymphocyte and the polymorphonuclear leucocyte of man and rabbit. Blood 5. 267–277 (1950).
12. Haper, W B. and Quigley H. J Alkaline phosphatase activity in granular leucocytes as test for early pregnancy Obstet. Gynecol. 17 238–242 (1961).
13. Hattori, K. and Jensen, W N Studies on alkaline phosphatase. Proc. 7th. Congr int. Soc. Haemat., Roma, 1958.
14. Hayhoe, F G. J and Quaglino, D Cytochemical demonstration and measurement of leucocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by modified azo-dye coupling technic. Brit. J Haemat., 4 375–389 (1958).
15. Ka H. D Plasma phosphatase. I. Method of determination. Some properties of the enzyme. J biol. Chem. 89 235–247 (1930)
16. Kerppola, W Observations on the phosphatase content of blood and bone marrow cells in normal and pathological hemopoesis. Blood 6. 454–465 (1951).
17 Knoblauch, M. Über die alkalische Phosphatase der neutrophilen Leukocyten. Helv med. Acta 29 143–155 (1962).
18. Lammers, K. Die alkalische Phosphataseaktivität der Blutzellen bei Leukosen und anderen pathologischen Zuständen. Z. klin. Med. 155. 178–190 (1958)
19. Lowry O. H. in Colowick, S. P and Kaplan, N. O. Methods in enzymology vol. IV p. 371 Acad. Press, New York (1957).
20. Merker, H. und Heilmeyer, L. Die Bedeutung der alkalischen Leukocytenphosphatase bei Reaktionen und Erkrankungen des myeloischen Systems. Schweiz. med. Wschr. 89: 1051 1052 (1959)

21 Merker, H. und Chew Yin Hoi: Alkalische Phosphatase und Glykogengehalt der reifen Neutrophilen im Verlauf von idiopathischen myeloproliferativen Erkrankungen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 66. 1050–1056 (1961).

22. Mitus, W J Mednicoff J B. and Dameshek, W Alkaline phosphatase of various neutrophils in various polycythemias New Engl. J Med. [illegible]: 1131 1133 (1959).

23. Nowell, P C. and Hungerford, D. A.: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J nat. Cancer Inst. 25. 85–93 (1960).

24 Perillie, P E. and Finch, S. C.: Alcaline phosphatase activity of exudative leucocytes in acute leucemia. Blood 18. 572, 580 (1961)

25. Plum, C. K. Die alkalischen Phosphatasen in den Zellen des normalen und pathologischen Knochenmarkes und des peripheren Blutes. Acta haemat. 4: 73–80 (1950).

26. Pritchard, J A.: Leucocyte phosphatase activity in pregnancy J Lab. clin. Med 50: 432–436 (1957)

27 Rheingold, J J and Wislocki, J B. Histochemical methods applied to haematology Blood. 3. 641–655 (1948).

28. Richterich, R. Enzymopathologie, Berlin 1958.

29 Rosenmund, H. Untersuchung über die saure Phosphataseaktivität. Helv med. Acta. suppl. 23, vol. 20 (1953).

30. Salvidio, E. Determination of enzymatic activity of the cells of acute and chronic leukaemia by the Carlsberg micromethod. Trans. 6th Congr europ. Soc. Haemat, Copenhagen 1957 (Karger Basel/New York 1958).

31 Sirola, J and Sirola, K.: A histochemical study of alkaline phosphatase in the leucocytes of blood and bone marrow in various diseases. Acta haemat. 18: 314–324 (1957)

32. Tanaka, K. R., Valentine, W N. and Fredricks, R. E.: Diseases of clinical conditions associated with low leucocyte alkaline phosphatase. New Engl. J. Med. [illegible]: 912 918 (1960).

33. Toyoda Shuichi Studies on leucocyte alkaline phosphatase. J. Kyushu haemat. Soc. 10 565–595 (1960).

34 Trubowitz, S. Feldman, M. A.; Benante, E. and Hunt V M. The alkaline phosphatase content of human leucocytes following marrow suppression by nitrogen mustard. J Lab. clin. Med. 52. 259–265 (1958).

35. Trubowitz, S.; Moschides, E. and Feldman, D.: Alkaline phosphatase activity of the polymorphonuclear leucocyte in rapidly induced leucopenia and leucocytosis. J Lab. clin. Med. 57 747 754 (1961).

36. Umeno, M. Studien über Phosphatase. V über die Glycerophosphatase der Leukocyten im Blut. Biochem. Z. 231 339–345 (1930)

37 Vannotti, A. Borel, Ch. Frei, J Cramer, I. et Ryser, H. Etude de l'activité enzymatique du leucocyte en physiopathologie humaine. Proc. 7th Congr Int. Soc. Blood Transfusion, Rome 1958 (Karger Basel/New York 1959)

38. Valentine, W N. and Beck, W S. Biochemical studies on leucocytes. I. Phosphatase activity in health, leucocytosis and myelocytic leukemia. J Lab. clin. Med. [illegible] 39–53 (1951)

39. Valentine, W N Follette, H.; Hardin, E. B.; Beck, W S. and Lawrence, J. S.: Studies on leucocyte alkaline phosphatase activity: relation to 'stress' and pituitary adrenal activity J Lab. clin. Med. 44 219–228 (1954)

40. Valentine, W N. The enzymes of leucocytes. Ann. N. Y Acad. Sci. 59: 1003–1011 (1955)

41. Valentine, W N Follette, J H.; Solomon, D. H. and Reynolds, J The relationship of leucocyte alkaline phosphatase to 'stress' to ACTH and to adrenal 17-OH-corticosteroids. J Lab. clin. Med. 49 723–737 (1957).

42. VALENTINE, W. N.: The metabolism of the leukemic leucocyte. Amer. J. Med. 28: 699-710 (1960).
43. WACHSTEIN, M.: Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. J. Lab. clin. Med. 31: 1-17 (1946).
44. WILLIAMS, M. J. AND [illegible], J. L.: Studies on the alcaline and acid phosphatase content of leucocytes in various haematological disorders. Texas Rep. Biol. Med. 12: 429-437 (1954).
45. WILLIAMS, M. J. AND [illegible], J. L.: Polycythemia vera terminating with myeloblastic leukemia. Correlation of morphologic findings with leucocytic phosphatase studies. Blood, 9: 89-195 (1954).
46. WILTSHAW, E. AND MOLONEY, W. C.: Histochemical and biochemical studies on leucocyte alkaline phosphatase activity. Blood 10: 1120-1131 (1955).

Adresse des auteurs: Drs. J. A. Antonioli, A. Baer et A. Vannotti, Clinique Médicale Universitaire, *Lausanne* (Suisse).

Acta haemat. 34 144–159 (1965).

Aus der Medizinischen Klinik mit Poliklinik der Universität Erl.
(Direktor: Prof. N. Henning)

Zur Charakterisierung von Myelomprote und Makroglobulinen

Von F. Scheiffarth, H. Götz und H. Lutz

Die im Plasma Myelomkranker auftretenden atypisch weißkörper sind seit Kenntnis dieser Proteine Gegenstand ma fältiger Untersuchungen, wie die bis heute nahezu unüberseh! einschlägige Literatur beweist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die verschiedenen Myelo typen mit Methoden zu charakterisieren, die einer Klinik auch zu routinemäßigen Diagnostik zur Verfügung stehen. Im einzelnen sollten die atypischen Proteine auf Grund ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in zwei verschiedenen Medien – Papier sowie Agargel – auf Grund von Färbungen und Fermentnachweismethoden sowie auf Grund von immunologischen Reaktionen mit Antihuman und Antimyelomseren beurteilt werden, um Aufschlüsse hinsichtlich ihrer Eiweißnatur und ihrer Beziehungen zu physiologischen Proteinsystemen im menschlichen Serum zu erhalten. Darüber hinaus sollten die differentialdiagnostisch verwertbaren Kriterien der verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung einzelner Proteintypen in Myelomseren und zur Abgrenzung gegen pathologische Makroglobuline herausgestellt werden.

Untersuchungsgut

Insgesamt wurden neun Myelomseren und ein Makroglobulinserum analysiert[1]
1. β_2-Myelom (Ro), 2. β_2-Myelom (Na), 3. γ_1-Myelom (Sal), 4. ... lom (Fa
5. γ_1-Myelom (Ri) 6. γ_1-Myelom (Ma) 7. γ_2-Myelom (Lo), 8. ... (Ful
9. γ Myelom (Se) 10. Makroglobulinämie-Serum (Fl).

---

[1] Die hier aufgeführte Typisierung der untersuchten Myel... nach der papierelektrophoretischen Konstellation.

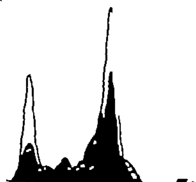


Abb. 1a
Alb. α_1- α_2- β- γ-Glob.
γ-Myelomprotein

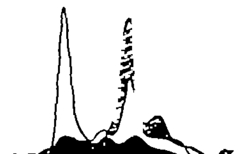


Abb. 1b
Alb. α_1- α_2- β- γ-Glob.
β-Myelomprotein



Abb. 1c
α_1 α_2- β- γ-Glob.
β-Myelomprotein
↓↓
bedingt durch das Phänomen
des »fettfleckähnlichen Glanzes«
Kontrolluntersuchung des Serums
der Abb. 1b nach 6 Monaten.

Abb. 1a–c zeigt die Diagramme der papierelektrophoretischen Analysen von verschiedenen Myelomseren nach Protein-, Kohlenhydrat- und Lipoproteidfärbung. Abb. 1a γ-Typ, Abb. 1b und c β-Typ zu verschiedenen Krankheitsphasen.

☐ Protein- ■ Kohlenhydrat- ▤ Lipoproteid-Färbung

Methodik

1. *Papierelektrophorese* mit nachfolgender Protein-, Glykoproteid- und Lipoproteidfärbung, wobei methodisch nach den Angaben von GRASSMANN und HANNIG (13, 14) vorgegangen wurde. Einzelheiten über die verschiedenen Färbetechniken finden sich unter anderem bei HEYWOOD (15) und SCHIFFARTH (42).

2. *Elektrophorese im Agargel*, jeweils im Vergleich mit einem Normalserum a) mit nachfolgender Protein-, Glykoproteid- und Lipoproteidfärbung, b) mit anschließendem Nachweis der Oxydase-, alkalischen Phosphatase- und Amylase-Aktivität.

Die elektrophoretische Auftrennung der Seren im Agargel wurde in klassischer Weise nach GRABAR und WILLIAMS (12a und 12b) vorgenommen. Für die zusätzlichen Reaktionen (Färbe- und Fermentreaktionen) sind folgende Literaturangaben zu berücksichtigen: Protein- und Lipoproteidfärbung (52, 54), Glykoproteidfärbung (43, 53, 54), Oxydaseaktivität (44, 50, 51), alkalische Phosphatase (47), Amylase (9, 43).

3. *Immunologische Untersuchungen.* a) Kreuzreaktionen im OUCHTERLONY-Schalentest, wobei auch hier nach dem einschlägigen Schrifttum vorgegangen wurde (35). Im einzelnen wurde von dem, jeweils im Verhältnis 1 : 1 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnten, Antigen bzw. Immunserum 0,05 ml in jede Aussparung eingelassen. Diffusion und Präzipitationsreaktion fanden bei Laboratoriumstemperatur statt. Als Immunseren kamen handelsübliche Antihuman- sowie Antimyelomseren¹ sowie ein selbst hergestelltes Antimyelomserum (s. u.) zur Anwendung. b) *Immunelektrophorese* nach GRABAR und WILLIAMS (s. o.) ebenfalls unter Verwendung von Antihuman- und Antimyelomseren.

4. *Herstellung des Antimyelomserums.* Ein Kaninchen wurde mit einem Mischserum von Myelomkranken der Typen β, γκ und γλ in folgender Weise sensibilisiert: Innerhalb von 42 Tagen wurden insgesamt 8 ml des unverdünnten Mischserums, in der Regel zu je 0,5 ml jeden zweiten Tag i. v. appliziert. Außerdem wurde am 4. und am 60. Tage der Injektionsserie je ein s. c. Depot von 3 ml Mischserum und 2 ml FREUNDschem Adjuvans² gesetzt. Das Ausmaß der Präzipitatbildung wurde im OUCHTERLONY-Schalentest geprüft.

Ergebnisse

1. *Die Papierelektrophorese* mit anschließender *Proteinfärbung* diente im wesentlichen der Typisierung der Myelomseren. Eine nähere Beschreibung der hier erhobenen Befunde erübrigt sich, da es sich um ausgeprägte Myelomseren handelt, deren papier-elektrophoretische Kriterien hinlänglich bekannt sind.

Ungeachtet der elektrophoretischen Position der hier untersuchten Seren zeigte sich bei *Glykoproteidfärbung* eine intensive Darstellbarkeit der jeweils atypischen Fraktion. Besonders auffällig war dabei der hohe Glykoproteidgehalt des Myelomproteins im Serum Fra (γκ-Typ) und im Serum Rü (βκ-Typ). Auch mit der *Lipoproteidfärbung* konnten alle Myelomfraktionen dargestellt werden. Allerdings waren die pathologischen Fraktionen nur bei vier Myelomseren intensiver angefärbt, während bei allen übrigen eher ein redu-

---

¹ Hyland-Laboratories, Vertrieb Travenol-International, München.
² DIFCO, Vertrieb Carl Roth, Karlsruhe.

zierter Lipoproteidgehalt des Myelomproteins aufzuzeigen war (Abb. 1a – c).

Im Falle der Makroglobulinämie fand sich eine nur gering konzentrierte atypische Fraktion ganz in der Nähe der Auftragestelle, die jedoch bei der Glykoproteidfärbung auffallend stark in Erscheinung trat. Auch die Lipoproteidfärbung ließ an dieser Stelle eine relativ deutliche Anfärbung erkennen (Abb. 2).

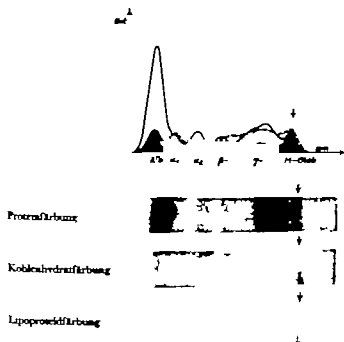


Abb. 2 Diagramme der papierelektrophoretischen Analysen eines Serums mit Makroglobulinämie Waldenström, wobei im γ-Globulin-Bereich bis zu 3 Komponenten abgrenzbar sind, eine unter ihnen imponiert als scharf begrenzte Fraktion mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit als die übrigen; sie bleibt praktisch an der Auftragestelle liegen. Sie läßt sich sowohl mit Schiffschem Reagens als auch mit Sudanschwarz B zur Darstellung bringen

2. Bei der *agarelektrophoretischen Untersuchung* der Myelomseren war eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der atypischen Proteine, auch unter den papierelektrophoretisch gleichartigen Typen auffällig. So lag nach Beendigung des Trennvorganges und Färbung mit Amidoschwarz 10B die Myelomfraktion des Serums Sai (γ-Typ) ausschließlich und scharf begrenzt im γ-Be

reich, die des Serums Lo (γ_2-Typ) im β_2-Bereich, die des Serums Fra (γ-Typ) mit langer Fahne im β_2/γ-Bereich das Myelomprotein des Serums Ri (γ-Typ) wanderte nur gering in die Zone der β_1-Globuline und blieb zum Teil an der Auftragestelle liegen die Myelomfraktion des Serums Se (γ_2-Typ) lag im Bereich der β_1-Globuline und reichte bis in die Gruppe der β_2-Globuline bei dem als β-Myelom klassifizierten Serum Rü lag die pathologische Fraktion im β_1 bei dem als β_2-Myelom definierten Serum Nü im β_2/γ-Bereich das Myelomprotein im Serum Prä (γ_2-Typ) war in zwei Fraktionen aufgespalten, wovon die größere im γ- die kleinere im γ_2-Bereich nachzuweisen war Bei dem Serum mit Makroglobulinämie WALDENSTRÖM war die atypische Fraktion nur knapp kathodisch von der Auftragestelle liegengeblieben.

Mit SCHIFFschem *Reagens* ließen sich die Myelomproteine in den beschriebenen Positionen intensiv anfärben. Auffällig war der hohe Glykoproteidgehalt des atypischen Proteins im Serum Ri (γ Typ). Bei der Lipoproteidfärbung mit *Sudanschwarz B* fiel im Bereich der Myelomproteine, ungeachtet welchen Typs, eine scharfe Aussparung auf, während die im α Bereich gelegenen Komponenten derselben Seren stärker angefärbt waren als von Normalseren gewohnt. Lediglich in drei Fällen (Seren Rü Prä, Fra) ließ sich im Zentrum der ausgesparten Myelomproteine eine schwache Blaugraufärbung erkennen.

Mit der *Peroxydasereaktion* ließ sich im Bereich der α_2-Globuline, des Auftragestriches und im Falle der Seren Prä, Se und Sai, fraglich auch im Bereich der Paraproteinfraktion, eine Braunfärbung darstellen.

Die *alkalische Phosphatasereaktion* konnte in allen Seren ausschließlich in der α_1 Fraktion nachgewiesen werden, wobei die Intensität in nur einem Falle (Serum Fra) stärker ausfiel als von Normalseren gewohnt. Das Serum mit Makroglobulinämie dagegen wies eine deutlich höhere alkalische Phosphataseaktivität auf, gemessen an der Farbreaktion.

Bei der Untersuchung der Seren auf *Amylaseaktivität* waren in allen hier untersuchten Fällen im Bereich der β_2/γ-Globuline deutlich zwei Komponenten darzustellen. Ein qualitativ wie quantitativ gleichartiger Befund war bei der Makroglobulinämie wie bei Normalseren zu erheben.

3 *Immunologische Ergebnisse* Im OUCHTERLONY-Schalentest war festzustellen daß bei Ansatz der Patientenseren gegen Antihuman-

serum (Anti-Normalserum) in allen Fällen eine relativ hohe Anzahl von Präzipitationslinien sichtbar wurde, von welchen die eine oder die andere mit dem vergleichsweise angesetzten Normalserum eine Kreuzreaktion bot. Bei Gegenüberstellung von β- und γ-Myelomseren waren ebenfalls einzelne Kreuzreaktionen offensichtlich (Abb. 3). Unter Verwendung des selbst hergestellten Antimyelom-

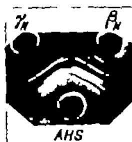


Abb. 3. Ouchterlony-Diffusionstest zur vergleichenden Analyse eines γ_N- und eines β_N-Myelomserums gegen ein Antihumanserum (Anti-Normalserum). Man erkennt deutlich neben Identitätsphänomenen Spornbildungen sowie Kreuzreaktionen, die eine partielle Identität bzw. eine Heterogenität verschiedener Systeme beweisen.

serums fiel lediglich mit einer Probe während der ersten Sensibilisierungsphase (am 10. Tage nach Sensibilisierungsbeginn abgenommen) auf, daß gegen das Serum eines Gesunden keine Präzipitate, gegen das Serum eines Patienten mit β- und gegen das eines Patienten mit γ-Myelom jedoch ein bis drei Komponenten nachweisbar wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich auch gegen ein Normalserum eine mehrfache Präzipitationsreaktion, die teilweise Identitätsphänomene, teilweise Kreuzreaktionen mit den Präzipitaten des spezifischen Antigen-Antikörpersystems des Normalserums zeigten. Darüber hinaus ergaben sich auch Präzipitatbildungen zwischen den verwendeten Immunseren, Antihumanseren von der Ziege und Antimyelomseren vom Kaninchen. Die angesetzten Proben der verschiedenen Myelomseren gegen ein handelsübliches Antimyelomserum zeigten in allen Fällen Präzipitatbildungen, die mit den spezifischen Präzipitaten des Normalserums gegen Antihuman(Normal)serum immunologische Identitätsreaktionen aufwiesen.

Die Ergebnisse der *Immunelektrophorese* haben gezeigt, daß einerseits ein Antihumanserum alle hier untersuchten an

AMS → Alb. α_1-α_2 β- γ-Glob.

γ_1-M γ_1 A γ_2 NS

γ_2-C γ_2-C-MS (γ_2-Typ nach Papierelektrophorese)

γ_2 A γ_2-A MS (β_2-Typ)

γ_2 B γ_2-B-MS (γ_1-Typ)

Erklärungen. AMS = Antimyelomserum, AHS = Antihumanserum (Anti-Normalserum) NS = Normalserum, MS = Myelomserum.

γ_2-A = γ_2-Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des ersten Drittels der γ Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

γ_2-B = γ_2-Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des mittleren Drittels der γ Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

γ_2-C = γ Myelomprotein, wobei die Anomalie im Bereich des letzten Drittels der γ_2-Präzipitationslinie in Erscheinung tritt.

Abb. 4. Immunoelektrophoretische Analysen dreier verschiedener Myelomseren im Vergleich zu dem Serum eines Gesunden unter Verwendung eines Antihumanserums sowie eines Antimyelomserums.

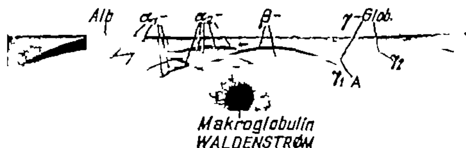


Abb. 5. Immunoelektrophorese eines Serums mit Makroglobulinämie WALDENSTRÖM, wobei das pathologische Makroglobulin offensichtlich in nur geringer Konzentration vorliegt (vgl. auch Abb. 21)

Myelomproteine unter Bildung eines charakteristischen Präzipitates zur Darstellung bringt diese Präzipitate der Myelomproteine unterscheiden sich allerdings in Position, Form und Intensität sowohl untereinander als auch von physiologischen Proteinsystemen Andererseits vermag ein Antimyelomserum neben den Myelomproteinen auch physiologische Komponenten auszupräzipitieren es handelt sich dabei um Fraktionen des α β- und γ-Globulin Bereiches wie auch um Albumin (Abb 4)

Das hier untersuchte Makroglobulinserum, das allerdings nur einen sehr geringen Anteil an hochmolekularem Protein besaß wies mit einem Antihumanserum im OUCHTERLONY-Schalentest, abgesehen von den normalen Eiweißsystemen, keine besonderen Kriterien auf. Immunoelektrophoretisch war die für eine Makroglobulinämie WALDENSTRÖM typische β_{1M}-Linie nicht nachweisbar Dagegen zeigte sich im Bereich der Auftragsstelle eine Präzipitatbildung die dem gering konzentrierten, nicht gewanderten und auch nicht diffundierten Makroglobulin entsprach (Abb 5) Gegen die verwandten Antimyelomseren kam es jedoch nicht zu einer spezifischen Präzipitationsreaktion im Bereich des Makroglobulins.

Diskussion

Die vorliegenden elektrophoretischen Ergebnisse zeigen unter Einbeziehung der Kohlenhydrat und Lipoproteidfärbungen, daß die Myelomproteine, unabhängig von ihrer elektrophoretischen Position, im wesentlichen Glykoproteidnatur besitzen. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Autoren (6 22a–b, 26 30 31 33 36 37 57 60) Nach LAURELL und Mitarbeitern (23) ist der Kohlenhydratanteil der von ihnen untersuchten Myelomproteine verschiedenartig Nach eigenen Erfahrungen beträgt der Anteil der Glykoproteidkomponente der verschiedenen Myelomproteine im Vergleich zur korrespondierenden Serumeiweiß-Fraktion zwischen 55 und 100 / Auf Grund von chemischen Bestimmungen der Serumpolysaccharide ist der Kohlenhydratreichtum der Myelomproteine auf eine starke Vermehrung der Hexosen zurückzuführen (31 33) Einige Autoren sehen in der Kohlenhydratanreicherung der Myelomfraktionen, und im übrigen auch des Paraproteins beim WALDENSTRÖM, ein differentialdiagnostisches Kriterium gegenüber anderen atypischen Proteinfraktionen, etwa bei Tumoren und

Systemerkrankungen (22 a–b 36) bei welchen sie einen relativ schwachen Kohlenhydratanteil fanden. Das gleiche gilt zur Abgrenzung gegenüber physiologischen Globulinen (60)

Die Beobachtungstatsache, daß bei KH Färbung der Myelomproteine im Vergleich zu Normalproteinen ein Unterschied des Farbtones in Richtung des violetten Spektrums angetroffen wird wie dies im übrigen auch Kuhn und Hartmann (22) hervorheben, ist u. E. nicht nur als Intensitätseffekt, sondern als Qualitätsunterschied aufzufassen.

Neben dem Kohlenhydratreichtum der Myelomfraktion selbst fiel in den meisten der hier untersuchten Seren eine, gegenüber der Norm stärkere Anreicherung der α_2-Glykoproteide auf, wahrscheinlich als Ausdruck eines allgemein reaktiven Prozesses. Gleiche Befunde werden bekanntlich auch bei akut-entzündlichen plasmazellulären und lymphoretikulären Reaktionen bzw bei Systemerkrankungen, sowie bei malignen vorwiegend generalisierten Tumoren angetroffen.

Die Beobachtung daß auch bei der Lipoproteidfärbung auf Papier im Bereich der Myelomfraktion eine deutliche, vielfach scharf begrenzte Komponente zur Darstellung gelangt, beweist eine gleichzeitige Anreicherung dieses atypischen Proteins mit Lipiden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Untersucher (18, 22 a–b 24 38, 41 55)

Bei diesen Färbeergebnissen sind jedoch gegenüber Normalbefunden zwei Besonderheiten hervorzuheben Die eine besteht darin, daß im Bereich der typischen Proteinkomponente ein intensiver fettiger Niederschlag sichtbar wird, der nur zum Teil mit Sudanschwarz anfärbbar ist. Dieses Phänomen wird auch in der einschlägigen Literatur erwähnt und wird auf eine acetonunlösliche Lipoidfraktion der Myelomlipoproteide zurückgeführt (38, 41 56) Die Lipidanreicherung im Bereich der Myelomfraktion soll vor allem in einer Anreicherung von Neutralfetten bestehen (56). Die andere Besonderheit besteht darin, daß das gleiche Phänomen des nicht homogen anfärbbaren Fettflecks im Albuminbereich zu beobachten ist. Hier handelt es sich mit Wahrscheinlichkeit um eine Vermehrung von schnell wandernden α-Lipiden.

Bei Makroglobulinämie Waldenström ließ sich die atypische Serumkomponente ebenfalls als Glyko- und Lipoproteid charakterisieren. Dabei erschien der relative Kohlenhydratgehalt im Vergleich zu den Myelomproteinen wesentlich höher wenn auch die Fraktion im vorliegenden Beispiel einen nur geringen Anteil des Serumspektrums ausmachte. Diese differentialdiagnostisch bemerkenswerte Beobachtung wird von einigen Autoren bestätigt (5 20 23 42) Man darf diese Tatsache wohl in Relation zum Molekulargewicht der entsprechenden Eiweißkörper setzen, wo-

nach schwere Proteine einen wesentlich höheren Kohlenhydratgehalt besitzen als solche mit einem niedrigeren Molekulargewicht (5) Gemessen an der Anfärbbarkeit mit Sudanschwarz erschien auch der Lipidgehalt der Makroglobulinfraktion im Vergleich zu Myelomproteinen höher außerdem fehlte das Phänomen mit dem fettfleckähnlichen Glanz (59)

Bei Vergleich der papierelektrophoretischen Ergebnisse mit den Befunden der Elektrophorese im Agargel zeigt sich, daß die verschiedenen Typen der Myelomproteine im Agargel, sowohl in ihrer elektrophoretischen Mobilität, als auch in der Differenzierung ihrer Proteinkomplexe, deutliche Unterschiede aufweisen, eine Beobachtung die auch von BREDA UND GASPAR (2) mitgeteilt wird. Allerdings konnten WALDENSTRÖM et al. (55) bei ihren Vergleichsuntersuchungen von Myelom- und Makroglobulinseren auf Papier und im Agargel keine erhebliche Diskrepanz finden.

Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im Agargel gegenüber dem Papier weist auf eine unterschiedliche Beschaffenheit der Myelomkomplexe hin. Agar als Trägermedium bietet hier infolge seiner Gitterstruktur ein besseres Auflösungsvermögen als Papier wobei nicht nur die Molekülgröße sondern auch dessen Struktur von Bedeutung sind. Bekanntlich lassen sich auf diese Weise insbesondere makromolekulare Proteine von solchen mit niederen Molekulargewichten differenzieren. In den oben beschriebenen Myelomfällen, in welchen, abweichend vom papierelektrophoretischen Befund, zusätzliche Eiweißsysteme im Bereich der Auftragestelle der Agarelektrophorese nachzuweisen waren, ist eine Beimengung von Makroglobulinen wahrscheinlich. Auf derartige Gegebenheiten wurde bereits auf Grund von Ergebnissen mit der Ultrazentrifuge hingewiesen (38, 58) Dies bestätigt auch die Glykoproteidfärbung, bei welcher besonders die starke Anfärbung des Serums Ri beeindruckte, dessen atypisches Protein an der Auftragestelle liegenblieb bzw nur gering kathodisch wanderte. Die relativ wenigen Angaben in der Literatur über gezielte Agargeluntersuchungen von Myelomseren mit besonderer Berücksichtigung der Glykoproteide bestätigen diese Beobachtungstatsache (1 53)

In Diskrepanz zu den papierelektrophoretischen Ergebnissen stehen die Resultate der Agarelektrophorese mit nachfolgender Sudanschwarzfärbung Wie bereits beschrieben, läßt sich im Agar keine oder allenfalls eine Spur von Lipoidfärbung im Bereich der

atypischen Proteinfraktion nachweisen. BALLIEUX (1) hat gleiche Befunde beschrieben. Auch bei Makroglobulinämien lassen sich im Bereich der atypischen Fraktion keine sudanophilen Anteile nachweisen, wie dies auch URIEL (53) mitteilt. Dieses Phänomen im Agar hängt mit der bekannten Eigentümlichkeit der Lipoproteide zusammen, daß diese sich aus offenbar lockerer Bindung von ihrem Trägerprotein lösen, weit anodisch wandern und sich vorwiegend im α_1-Bereich, gering konzentriert auch in der Zone des Albumins und der Präalbumine niederschlagen. Dabei erscheint die Intensität dieser Lipoproteidkomponenten größer als die in Normalseren. Bei Vergleichen mit Direktbestimmungen in Myelomseren, sowie mit den papierelektrophoretischen Ergebnissen, dürfte die Wahrscheinlichkeit von Lipideigenschaften der Myelomproteide nicht in Zweifel gezogen werden. Die verschiedenen besonderen Phänomene auf Papier wie in Agar lassen jedoch auf die Möglichkeit schließen, daß es sich bei der Anreicherung von Lipiden um eine andersartige Zusammensetzung des Myelom-Lipoproteids handelt als bei physiologischen Serumlipiden.

Über die Beobachtungstatsache, daß die an die Coeruloplasminfraktion gebundene Oxydasereaktion zumeist verstärkt ausfällt, wurde bereits an anderer Stelle berichtet (8 44)

Bei den erwähnten Befunden mit Erhöhung der alkalischen Phosphataseaktivität handelt es sich um Patienten mit erheblichen Knochenveränderungen. Es ist anzunehmen, wie im übrigen auch in der Literatur diskutiert wird (25 29) daß die alkalische Phosphatase im allgemeinen im Normalbereich bleibt und erst bei Komplikationen erhöht ist.

Die Amylaseaktivität scheint auf Grund vorliegender rein qualitativer Ergebnisse keine Abweichungen gegenüber der Norm aufzuweisen. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die Paraproteine keine Fermentaktivität besitzen.

Die immunologischen Resultate mit Hilfe der verschiedenen Geltechniken haben gezeigt, daß Myelomeiweißkörper keine unerschütterlichen Kriterien als »Paraproteine« gegenüber physiologischen Globulinen zeigen, wie dies vielfach behauptet worden ist. Zumindest bestehen partielle Immunitätsreaktionen zwischen den genannten Eiweißgruppen. Dies wird damit bewiesen, daß spezifische Antimyelomseren neben dem atypischen Protein auch die physiologische Fraktion ausprazipitieren, und daß Antinormalseren

auch die unter pathologischen Bedingungen entstandenen Eiweißkomponenten zur Darstellung bringen. Die verschiedenen Konstitutionstypen, die sich durch ihre unterschiedliche papier und agar elektrophoretische Mobilität differenzieren lassen, zeigen sowohl gegen Antihumanserum als auch gegen die Antimyelomseren gleiche Präzipitationsäquivalente. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß zwischen den verschiedenen Myelomtypen hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften keine Unterschiede bestehen. Zu gleichartiger Auffassung gelangten auch andere Autoren (3 19 21 27 28, 32, 34 46 48)

Erweiterte immunologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Myelomproteine sich immunologisch wie physiologische Serum eiweißkörper des β/γ-Systems (einschließlich der Subfraktionen β_{2A} und β_{2M}) verhalten, die jedoch die dieser Gruppe eigenen speziﬁschen Antikörpereigenschaften verloren haben (10) Man erklärt dies durch eine abnorme Primärstruktur Es fehlt ihnen ein Teil der Antigendeterminanten der entsprechenden Immunglobuline, sie verfügen jedoch offenbar über individualspezifische bzw gruppenspezifische Antigendeterminanten, die die normalen Immunglobuline wiederum nicht besitzen (4 11 16 39 40 49) Die Kreuzreaktion zwischen Makroglobulinseren, Antinormalserum und Antimyelomseren zeigen einen deutlichen Unterschied in den immunologischen Proteineigenschaften der Eiweißkörper vom Typ der Makroglobulinämie WALDENSTRÖM einerseits und den verschiedenen Myelomproteinen andererseits.

Somit kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen das Myelomprotein folgendermaßen charakterisiert werden Es handelt sich um zumeist quantitativ stark angereicherte Eiweißkörper mit zwar unterschiedlicher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit, aber gleichartiger d. h. gemeinsamer Grundstruktur Es bestehen enge Beziehungen zu den entsprechenden physiologischen Proteinen, sie unterscheiden sich jedoch von diesen funktionell, worin wohl der atypische Charakter am ehesten zu sehen ist.

An der Herkunft dieser atypischen Proteine besteht heute kein Zweifel mehr Es ist nur noch nicht restlos geklärt, inwieweit die verschiedenen elektrophoretisch und immunologisch differenzierbaren Proteintypen verschiedenen Funktionsphasen der Myelomzelle zuzuordnen sind oder vielleicht verschiedenen Reife- bzw Entwicklungsgraden entstammen.

Zusammenfassung

Zur Charakterisierung von Myelomproteinen gegenüber Makroglobulinen und Normalproteinen wurden verschiedene papier- und agarelektrophoretische, färberische sowie Fermentnachweismethoden angewandt. Myelomproteine besitzen im wesentlichen Glykoproteidnatur. Hinsichtlich der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und Differenzierbarkeit von Myelomproteinen bestehen erhebliche Unterschiede in den Befunden der Agargel- und der Papierelektrophorese. Die atypischen Proteine wiesen keine Aktivität von Oxydase, Amylase und alkalischer Phosphatase auf. In immunologischer Hinsicht bestehen enge Beziehungen zu den entsprechenden physiologischen Proteinen. Myelomproteine unterscheiden sich aber von physiologischen Proteinen durch fehlende funktionelle Eigenschaften. Myelomproteine sind immunologisch von Makroglobulinen präzise abgrenzbar, obwohl sie in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (als Glykoproteide) weitgehend mit diesen übereinstimmen.

Summary

Various paper and agar electrophoretic staining techniques and enzyme determination methods were used to distinguish between myeloma proteins on the one hand and macroglobulin and normal protein on the other. Myeloma proteins are essentially similar to glycoproteins. There are considerable differences in the results of agargel- and paper electrophoresis in relation to the rate of migration and differentiation of myeloma proteins. The atypical protein shows no oxydase, amylase and alkalin phosphatase activity. Immunologically there is close relationship to the appropriate physiological protein. Myeloma protein is distinguished from physiological protein by the absence of functional characteristics. Myeloma protein can be clearly differentiated from macroglobulin immunologically although (as a glycoprotein) it is largely identical with the latter in its physicochemical properties.

Résumé

Pour différencier les protéines du myélome des macroglobulines, nous avons employé l'électrophorèse sur papier et sur agar ainsi que différentes méthodes fermentatives et de coloration. Les protéines du myélome sont essentiellement de nature glycoprotéique. Les études à l'aide de l'électrophorèse sur papier et sur agar donnent des résultats très différents sur la vitesse de migration des protéines du myélome et sur les possibilités de différenciation. Les protéines atypiques n'ont pas d'activité d'oxydase, d'amylase et de phosphatase alcaline. Du point de vue immunologique, il existe des relations étroites avec les protéines normales. Les protéines du myélome diffèrent des protéines normales par le manque de certaines propriétés fonctionelles. Les protéines du myélome peuvent être différenciées de façon précise des macroglobulines par des méthodes immunologiques quoique leurs propriétés physico-chimiques (en tant que glycoprotéines) correspondent largement.

Literatur

1. Ballieux, R. E., Imhof, J. W. and Niehaus, G. H.: Identification of so-called atypical macroglobulinemia as an atypical form of β_{2A}-paraproteinemia. A new immunological entity. Nature, London *188*: 768–770 (1961).
2. Brito, H. L. und Gaspar, E.: Das Proteinogramm auf Papier und auf Agargel (Vergleichende Untersuchung einiger Diagramme in Fällen von Myelom). Gaz. méd. port. *13*: 604–608 (1960).
3. Buffe, D., Terrier, Th. et Burtin, P.: Étude quantitative de la β_{2M}-globuline dans les sérums de myélome. Rev. franç. Ét. clin. biol. *7*: 292–293 (1962).

4. Carbonara, A. O.; Mancini, G. and Lortie, R.: Studies on normal and pathological γ_{1M}-globulins and their subunits. Prot. Biol. Fluids. 11th. Coll., p. 45 (Verlag Elsevier Publ. Comp., Amsterdam/London/New York/Princeton 1963)
5. Cirla, E.; Salteri, F.; Colombo, B.: Osservazioni sulle caratteristiche dei carboidrati sierici in pazienti con mieloma e con sindrome di Waldenström. Haemat. lat., Milano 4 303–311 (1960).
6. Gergely, J.; Jakob, L.; Mitrova, L.; Szelay, G. und Zolle, R.: Untersuchungen mit β-Myelomeiweißkörpern, mit bes. Rücksicht auf deren Antigeneigenschaften. Z. ges. inn. Med. 15, 946–952 (1960).
7. Götz, H.; Berg, G. und Scheiffarth, F.: Methodische Grundlagen der Immunoelektrophorese. Z. Immun. Forsch. 114 72 (1957).
8. Götz, H. und Scheiffarth, F.: Über die Änderung der Serum-Unterfraktionen, insbesondere der β-Immunfraktionen, im Verlaufe der Myelomkrankheit. Acta haemat. 25, 361–367 (1961)
9. Götz, H.; Scheiffarth, F. und Hoffmann, D.: Diastasenachweis in einigen menschlichen Organextrakten mit Hilfe der Elektrophorese im Agargel. Z. Gastroent. 2: 76–78 (1964)
10. Grabar, P.: Anticorps et «Globulines-Transporteurs». Prot. Biol. Fluids. Proc. 11th Coll. Bruges 1963 (Verlag Elsevier Publ. Comp., Amsterdam/London/New York/Princeton).
11. Grabar, P.; Fauvert, R.; Burtin, P.; Hartmann, L.; Courcon, J.; Cavillon, J. et Bouffard, M.: Étude sur les protéines du myélome. II. L'analyse immuno-électrophorétique des sérums de 30 malades. Rev. franç. Ét. clin. biol. 1 175–186 (1956).
12. Grabar, P. et Williams, C. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. Biochim. biophys. Acta 10 193 (1953). Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. biophys. Acta 17 67 (1955)
13. Grassmann, W. und Hannig, K.: Über ein Verfahren zur Stofftrennung durch Kataphorese. Angew. Chemie 62, 170 (1950)
14. Hannig, K.: Papierelektrophorese in der Eiweißchemie. In Hoppe-Seyler's und Thierfelder's Handbuch der physiol. und path. chem. Analyse, 8. Aufl. IV/1 (1960)
15. Henning, N.: Klinische Laboratoriumsdiagnostik (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1960)
16. Heremans, J. F.: Les globulines du sérum humain. Leur nature et leur valeur pathologique (Masson, Paris 1961)
17. Heremans, J. F.; Heremans, M. Th.; Laurell, A. H. F.; Laurell, C. B.; Waldenström, J.; Martensson, L. and Sjöquist, J.: Studies on abnormal serum globulins (M-components) in myeloma, macro-globulinemia and related diseases. Acta med. scand. 170: Suppl. 367 7–126 (1961).
18. Hill, R. M.; Mulligan, R. M. and Dunlop, S. G.: Plasma cell myeloma associated with high concentration of plasma lipoprotein. Amer. J. Path. 24 689 (1948)
19. Imamori, K. and Mosel, M.: Globulin and myeloma: the structural characterization of γ-globulin and myeloma protein. Arch. Biochem. 97 236–242 (1962).
20. Kremel, M.: Die proteingebundenen Kohlehydrate in isolierten Eiweißfraktionen bei Hypergammaglobulinaemie und Paraproteinaemien. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 694 (1961)
21. Korngold, L. and Lipari, R.: Multiple-myeloma proteins. I. Immunological studies. Cancer 9: 183–192 (1956).
22. Klupe, R. A. und Hanisch, A.: Qualitative und quantitative Untersuchungen des Serums Plasmocytomkranker. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 64 134–137 (1959)

Beitrag zum Verhalten der Lipo- und Glykoproteide beim Plasmocytom. Klin. Wschr 36. 908–911 (1958).

23. LAURELL, C. B. LAURELL, H. UND WALDENSTRÖM, F.: Glycoproteins in serum from patients with myeloma, macroglobulinemia and related conditions. Amer J. Med. 22. 4–36 (1957).

24. LEONARD-JONES, J E. Myelomatosis with lipaemia and xanthomata. Brit. med. J I. 781 783 (1960).

25. LEPOW H. SCHOENFELD M. R.; MOSSAKOWY CH. R. AND OTT T: Nonprostatic causes of acid hyperphosphatasia. Report of a case due to multiple myeloma. J Urol., Baltimore 87 991–993 (1962)

26. MAGRELLA, R. AND SCARPINO, L. Carbohydrate content of anomalous seroglobulin and BENCE JONES protein in myeloma. A comparative study Clin. chim. Acta 6. 403–406 (1961)

27 MANNIK, M. AND KUNKEL, H. G. Classification of myeloma proteins, BENCE JONES proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters. J. exp. Med. 116 859–877 (1962).

28. MARTIN, E. ET SCHEIDEGGER, J J Myélomatose diffuse et immunoélectrophorèse. Schweiz. med. Wschr 87 439–442 (1957)

29 MARTIN, N. H. AND SCHLUMBERGER, H. The non-protein constituents of the plasma in myelomatosis. J clin. Path. 11 530–533 (1958).

30. McCONNELL, R. J AND MARTIN, N H. The myeloma globulins. Brit. J Cancer 12 264–274 (1958).

31 McFARLAN, A. S. Serum protein changes in multiple myelomatosis. Clin. Radiol. 12. 29–30 (1961)

32. MORTON, J I. AND DEUTSCH, H. F Some immunochemical relations of BENCE JONES and hyperglobulinemic serum proteins of multiple myeloma patients. Cancer Res. 18. 1221–1224 (1958)

33. NIKKILÄ, E. A. AND PESOLA, R. Serum protein-bound carbohydrate pattern in normal subjects and in patients with multiple myeloma. Scand. J clin. Lab. Invest. 12 209–220 (1960)

34. OSSERMAN, E. F AND LAWLOR, D Immunoelectrophoretic characterization of the serum and urinary proteins in plasma cell myeloma and WALDENSTRÖM' macroglobulinemia. Ann. N Y Acad. Sci. 94 93–109 (1961)

35. OUCHTERLONY Ö. Antigen-antibody reactions in gels. Ark. Kemi, Min. Geol. B 26. 1 (1949

36. PAGNI, G. Le glicoproteine del siero nelle affezioni maligne. Folia endocrin. 13 704–14 (1960)

37 RICE, W G AND YAMAMURA, M. The occurrence of a PAS-positive protein fraction in paper electrophoresis of serum in myelomatosis. J Lab. clin. Med. 44 544 (1954).

38. RIVA, G. Das Serumeiweißbild, p. 345 (Hans Huber Bern/Stuttgart 1957).

39 ROCKEY D L. A. SPENGLER, G. A. UND HÄSSIG, A. Immunoelektrophoretische Untersuchungen an Paraproteinen. Cancro (Torino) 14 600–620 (1961).

40. ROCKEY D L. A. SPENGLER, G. A. GUGLER, E. RICCI, C.; RIVA, G. UND HÄSSIG, A. Antigenanalytische Untersuchungen an Paraproteinen. Helv med. Acta 28 1 28, 127 143 (1961)

41 SACHS, M. D BERNARD G. A. CADY P AND ROSS, G. An abnormal lipid-like material and carbohydrate in the Sera of Patients with multiple Myeloma. Amer. J Med. 17 66.–669 1954

42 SCHETTLER, F BERG, G UND GÖTZ, H. Papierelektrophorese in Klinik und Praxis (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1962)

43. SCHETTLER, F UND GÖTZ, H. Eine Methode zum Diastasenachweis papierelektrophoretisch getrennter Proteingemische. Klin. Wschr 42 150–151 (1964).

44. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Czaganyi, F. Zur quantitativen Bestimmung der Coeruloplasminkonzentration im Serum (Unter bes. Berücksichtigung von Leberparenchymerkrankungen und malignen Prozessen). Med. Welt 28 1449–1453 (1961).
45. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Kropff, H. Die Bedeutung kombinierter Färbeverfahren nach immunelektrophoretischer Analyse pathologischer Seren. Acta haemat. 26, 169–181 (1961).
46. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Sorkoll, K. Immunoelektrophoretische Studien an Myelomseren. Klin. Wschr. 36, 82–86 (1958).
47. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Warnatz, H. Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Serum mit Hilfe der Agarelektrophorese. Med. Welt: 2216–2220 (1962).
48. Da Silva, A. B.; Da Costa, S. F. und Da Silva, J. A. F. Versuche mit einem Immuno-Serum spezifischen Anti-Serums in einem Fall von Myelom. Isolierung eines anormalen und spezifischen Proteides (Vorl. Mitteilung). Gaz. méd. port. 13, 597–603 (1960).
49. Spengler, G. A.; Roulet, D. L. A.; Butler, R.; Hässig, A. und Riva, G. Zur Antigenanalyse von Paraproteinen. Schweiz. med. Wschr. 90: 1262–1264 (1960).
50. Uriel, J. Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose. Bull. Soc. Chim. biol. 39 Suppl. 1 105 (1957).
51. Uriel, J.; Götz, H. et Grabar, P. Etude de la céruloplasmine du sérum humain par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique. Microdétection colorimétrique du cuivre lié aux protéines. Schweiz. med. Wschr. 87 431 (1957).
52. Uriel, J. et Grabar, P. Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. Ann. Inst. Pasteur 90: 429 (1956).
53. Uriel, J.; Grabar, P. et Wunderly, Ch. Etude d'un sérum de macroglobulinémie par l'électrophorèse en gélose et sur papier et par ultracentrifugation. Clin. chim. Acta 2: 35 (1957).
54. Uriel, J. et Scheidegger, J. J. Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. Bull. Soc. Chim. biol. 37 165 (1955).
55. Waldenström, J. Abnormal Proteins in Myeloma. Adv. intern. Med. 5, 398 (1952).
56. Weicker, H. Der Nachweis von acetonunlöslichen Lipoproteinen im Plasmocytomeiweiß und Bence Jones Eiweißkörper. Dtsch. Arch. klin. Med. 203 79–81 (1956).
57. Wuketich, St. und Siebenmann, G. Plasmocytom mit atypischer Makroglobulinaemie. Beitrag zur Frage der nosologischen Stellung der sogenannten atypischen Makroglobulinaemie. Medicine, Balt. 205, 213–230 (1958).
58. Wuhrmann, F. und Wunderly, Ch. Die Bluteiweißkörper des Menschen. Untersuchungsmethoden und deren klinisch-praktische Bedeutung (Benno Schwabe, Basel 1952).
59. Wunderly, Ch. und Piller, S. Die Färbung der im Blutserum enthaltenen Proteine, Lipoide und Kohlehydrate nach Papierelektrophorese. Klin. Wschr. 32 425 (1954).
60. Yagi, A.; Fukuda, M. and Akizai, T. A case of multiple myeloma with reference to immunoelectrophoretic analysis of myeloma protein. Sapporo med. J. 16, 411–424 (1959).

Adresse der Autoren: Prof. F. Scheiffarth, Dr. H. Götz und H. Lutz, Med. Klinik und Poliklinik, Erlangen (Deutschland).

Acta haemat. 34 160–174 (1965).

Aus der Abteilung für klinische Immunpathologie der Medizinischen Universitätsklinik, Freiburg im Breisgau

Untersuchungen über kältelabile und wasserlabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien

Von H. Schubothe, S. Raju und D. Klemm

Seit den Mitteilungen von Wintrobe und Buell (9) v. Bonsdorf et al. (1), Waldenström (8) sowie Lerner und Watson (3) sind bei Patienten mit Paraproteinämien und Dysproteinämien (4) oft kältelabile Serumkomponenten beobachtet und beschrieben worden. Lerner und Watson haben sie unter dem Terminus «Kryoglobuline» zusammengefaßt. Grundsätzlich können solche Serumkomponenten bei niedriger Temperatur zu drei verschiedenen wärmereversiblen Phänomenen führen: (1) Kältepräzipitation und/oder (2) Kältegelifikation und/oder (3) abnorme Kälteviskositätssteigerung (vgl. 6). Seren, die bei Abkühlung eine erhöhte Viskositätszuwachsrate zeigen, sind meist auch schon bei 37 °C visköser als normale. Reihenuntersuchungen über die Häufigkeit und den Intensitätsgrad von Kältelabilitätsphänomenen in dysproteinämischen und paraproteinämischen Seren sind unseres Wissens bisher noch nicht durchgeführt worden. Das gilt auch für das Trübungsphänomen («Euglobulintest»), das nach Eintropfen von Seren in destilliertes Wasser zu beobachten ist (8). Wir möchten im folgenden über die Resultate solcher Reihenuntersuchungen berichten.

Auch der mikroskopischen Beschaffenheit kältelabiler und wasserlabiler Proteine ist bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Nach einer vorläufigen Mitteilung über das phasenkontrastmikroskopische Bild kältepräzipierender Serumkomponenten (7) möchten wir hier weitere phasenoptische Befunde mitteilen, die außer an kältepräzipierenden, auch an kältegelierenden und abnorm viskösen Seren sowie an wasserlabilen Proteinen erhoben wurden.

Untersuchungsgut und Methodik

Die Reihenuntersuchungen wurden durchgeführt an 50 Seren gesunder Personen im Alter von 20 bis 28 Jahren (33 Männer und 17 Frauen), 50 Seren von Patienten mit Dysproteinämien (35 chronische Leberkrankheiten, 11 chronische entzündliche Erkrankungen, 4 maligne Tumoren), bei denen eine starke Beschleunigung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und ausgeprägte Veränderungen im Papierpherogramm (Globulinvermehrungen mit breitbasigen Gradienten), jedoch keine Hinweise für eine Paraproteinämie bestanden und 58 Seren von Patienten mit Paraproteinämien (25 Plasmocytome, 18 Makroglobulinämien, 8 chronische Kälteagglutininkrankheiten, 7 atypische paraproteinämische Hämoblastosen).

Bei der Gewinnung der Seren wurde eine Abkühlung unter Körperinnentemperatur sorgfältig vermieden. Sofort nach der Präparation wurden mehrere Proben des Serums in Wasserbäder verschiedener Temperaturen verbracht und nach 2 bzw. 24 Stunden auf eine etwaige Trübung und/oder Gelierung beurteilt sowie ihre Viskosität innerhalb von 2 Stunden nach dem Kugelfallprinzip gemessen (Technische Einzelheiten s. 6). Die 58 Paraproteinämien umfassen 16 Fälle aus den Jahren 1962 und 1963, bei denen noch keine 2-Stundenwerte, sondern nur 24-Stundenwerte für die Beurteilung auf Kältepräzipitation und -gelierung erhoben worden waren.

Für die Prüfung auf wasserlabile Proteine (Euglobulintest) benutzten wir eine große Küvette aus Kristallglas (6×6×25 cm), die vor einem geschwärzten Hohlraum zur Gewährleistung eines absolut dunklen Hintergrundes gestellt und von beiden Seiten indirekt beleuchtet wurde. Die Küvette wurde mit destilliertem Wasser gefüllt. Von dem zu untersuchenden Serum wurden 1 bis 2 Tropfen mit einer Pasteurpipette eingetropft und während des Absinkens auf ihren Trübungsgrad durch semiquantitative Schätzung ([+] bis ++++) beurteilt.

Phasenoptisch wurden auf kältelabile Komponenten insgesamt 17 dysproteinämische Seren untersucht. Nachdem ein Phasenkontrastmikroskop in einem Kühlraum von +4 °C vortemperiert worden war, wurde zunächst bei Zimmertemperatur von ca. 22 °C ein Tropfen Serum auf einen Objektträger verbracht, mit Deckglas und Paraffinumrandung versehen, darauf im Kühlraum mikroskopisch sofort und nach verschieden langen Zeiten (bis 24 Stunden) beobachtet, resp. fotografiert (vgl. 7).

Wasserlabile Proteine wurden für die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung so präpariert, daß nach Eintropfen von dysproteinämischen oder paraproteinämischen Seren in destilliertes Wasser die entstehende Trübung zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes auf einen Objektträger gebracht, mit Deckglas versehen und bei Zimmertemperatur mikroskopisch betrachtet und fotografiert wurde.

Ergebnisse

I. Die *Häufigkeit und der Intensitätsgrad der Labilitätsphänomene* in den untersuchten Seren sind in den Abbildungen 1 bis 3 und 5 graphisch registriert. Um eine übersichtliche Darstellung zu erhalten, haben wir hier die drei untersuchten Serumkollektive summarisch ausgewertet ohne Berücksichtigung der individuellen Krankheitsbilder.

A. Kältepräzipitation

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß in den von uns untersuchten *normalen Seren* weder nach 2 Stunden noch 24 Stunden im

Normale Personen | Dysproteinämien | Paraproteinämien

2 Std: ++++ – / +++ / ++ / + / (+)

24 Std.: ++++ – / +++ / ++ / + / (+)

Abb. 1 Häufigkeit und Stärkegrad von Kältepräzipitationen in 50 dysproteinämischen und 58 paraproteinämischen Seren verglichen mit 50 normalen Kontrollseren nach 2- bzw. 24stündigem Verbleib der Seren im Eiswasserbad (2-Stundenwerte bei Paraproteinämien nicht registriert).

Eiswasserbad eine Kältepräzipitation zu beobachten war. Von den *dysproteinämischen Seren* zeigten 12 nach 2 Stunden, 24 weitere (also insgesamt 36) nach 24 Stunden eine mehr oder minder starke Trübung, die sich beim Zentrifugieren im Eismantel nach unten absetzte und im Wasserbad von 40° C kurzfristig wärmereversibel war. Die Intensität der Trübung war in den nach 2 Stunden bereits präzipitierenden Serumproben nach 24 Stunden deutlich stärker geworden. Die Frequenz positiver Resultate ist überraschend hoch, was unseres Wissens bei Dysproteinämien bisher noch nicht beschrieben worden ist. Von den *paraproteinämischen Seren* sind in Abb. 1 lediglich die 24-Stundenwerte registriert, weil die 2-Stundenwerte nur von 42 Seren vorliegen, darunter 13 mit eindeutiger Trübung, die in 3 Fällen bereits nach wenigen Sekunden begann (vgl. 5). Die 24-Stundenwerte lassen in 37 der 58 Seren eine positive Kältepräzipitationsreaktion erkennen, die nur in 3 Fällen einen wesentlich stärkeren Grad als bei den untersuchten dysproteinämischen Seren erreichte.

Zusammenfassend sprechen die Befunde dafür, daß eine Kältepräzipitation in normalen Seren nicht vorzukommen scheint, bei Erkrankungen mit pathologischem Eiweißbild aber ein sehr häufi-

Normale Personen — Dysproteinämien — Paraproteinämien

++++ –

+++

++

+

(+)

Abb. 2. Häufigkeit und Stärkegrad von Kältegelifikationen in 58 paraproteinämischen Seren nach 2 bzw. 24stündigem Verbleib der Seren im Eiswasserbad. Fehlen des Phänomens in 50 dysproteinämischen und 50 normalen Seren.

ges Phänomen ist und nicht nur bei Paraproteinämien (in rund zwei Dritteln der untersuchten Fälle), sondern auch bei Dysproteinämien (in rund drei Vierteln der untersuchten Fälle) nachweisbar ist.

B. *Kältegelifikation*

Abb. 2 zeigt, daß in keinem der untersuchten *normalen* und *dysproteinämischen Seren* nach 2 oder 24 Stunden im Eiswasserbad eine Gelierung zu beobachten war. Dieses Phänomen blieb auf die *Paraproteinämien* beschränkt. Hier trat es in 6 Fällen in verschieden starkem Grade ein und begann bereits eine oder wenige Minuten nach der Abkühlung. Das Maximum war nach 15 bis 120 Minuten erreicht, so daß die in Abb. 2 registrierten 2-Stundenwerte von den 24-Stundenwerten nicht differieren. Bemerkenswert ist, daß in manchen Seren, die 2 Tage oder länger im Kühlschrank bei ca. + 5° C gestanden hatten, die Kältegelbildung nicht mehr reproduzierbar war, was für eine Inaktivierung des Phänomens durch Alterung des Serums spricht.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Kältegelifikation ein ziemlich seltenes Phänomen ist, das weder in Seren normaler Menschen noch, soweit bisher bekannt, bei Dysproteinämien vorzukommen scheint. Bei Paraproteinämien findet es sich in unserem Beobachtungsgut in etwa einem Zehntel der Fälle (4 Plasmocytome, 2 Makroglobulinämien).

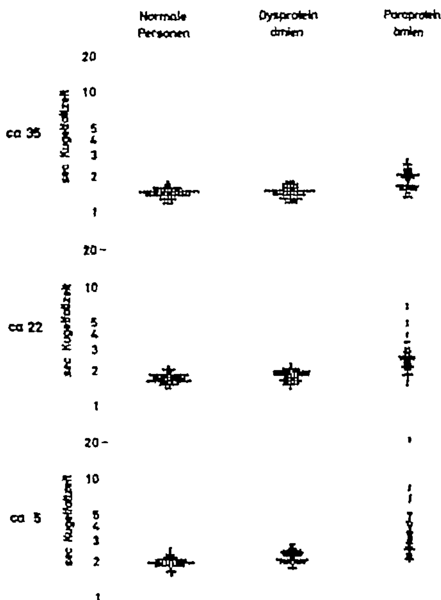


Abb. 3. Häufigkeit und Stärkegrad abnormer Viskositätserhöhung in 52 paraproteinämischen Seren verglichen mit 30 normalen und 30 dysproteinämischen Kontrollseren. (6 kältegelifizierende Paraproteinseren sind hier nicht mitregistriert).

C. Abnorme Kälteviskositätssteigerung

Die Viskositätswerte (angegeben in Sekunden Kugelfallzeit bei ca. 35 ca. 22° und ca. 5) der drei untersuchten Serumkollektive sind aus Abb 3 zu entnehmen. Die *Normalseren* zeigten auf allen drei untersuchten Temperaturstufen Streuungen von annähernd statistischer Verteilung mit Mittelwerten von 1 46 sec (35) 1 7 sec (22°) und 2 05 sec (5) Die Viskosität der *dysproteinämischen Seren* weicht von der Norm wenig ab Die obere physiologische Grenze wird bei 35 nicht, bei 22 in 1 Fall, bei 5 in 3 Fällen wenig überschritten. Die Mittelwerte betragen bei 35 1 48 sec, bei 22 1 77 sec, bei 5 2,25 sec. Von diesem weicht nur der letztere signifikant von dem entsprechenden Normalwert ab (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1 /) Hier deutet sich also eine (allerdings minimale) Viskositätszunahme bei Temperaturerniedrigung an. Von den *paraproteinämischen Seren* wurden 6 in die Abbildung 3 nicht mit aufgenommen, weil sie in der Kälte gelierten und eine verlängerte Kugelfallzeit oberhalb 5 bei ihnen vermutlich durch beginnende Gelbildung bedingt war nicht durch die der reinen Viskositätsvermehrung zugrunde liegende molekulare Modifikation. Die Einzelwerte dieser Seren lagen auf der 35 -Stufe zwischen 4,5 und 13 sec, auf der 22 -Stufe zwischen 4 4 und 21,3 sec, auf der 5 -Stufe zwischen 4,2 und 20 sec (in einem Fall bei unendlich) Das Kollektiv der restlichen 52 Seren zeigt im Gegensatz zu den dysproteinämischen ein ausgeprägt pathologisches Befundsmosaik. In 30 Fällen wird bereits auf der 35 -Stufe die obere Grenze der normalen Viskositätsspielbreite überschritten. Diese Zahl erhöht sich bei 22 auf 33 bei 5 auf 35 Nur die Werte von 17 Seren, also etwa einem Drittel der Fälle, liegen ganz innerhalb der Normalbreite. Die pathologischen Seren haben ferner einen gegenüber der Norm erhöhten Viskositätszuwachs mit fallender Temperatur

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß in den untersuchten dysproteinämischen Seren die normale Viskositätsspielbreite nur in vereinzelten Fällen um sehr geringe Werte überschritten wird und sich aus den Mittelwerten nur eine minimale Viskositätszunahme bei Abkühlung auf 5 C ergibt. Von den paraproteinämischen Seren verhalten sich rund zwei Drittel pathologisch, wobei die Viskositätswerte auf den einzelnen Temperaturstufen verschieden stark, zum Teil extrem stark erhöht sind, und die Viskositäts-

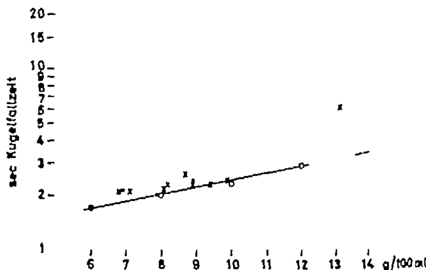


Abb. 4 Relation zwischen Serumviskosität (22 °C) und Serumgesamteiweiß bei 23 Fällen von Paraproteinämie mit Serumviskositätserhöhung. Schwarze Punkte: Makroglobulinämien Waldenström. Kreuze: Plasmocytome. Kreise: Humangammaglobulinlösungen verschiedener Konzentrationen.

Normale Personen — Dysprotein ämien — Paraprotein ämien

++++ -

+++

++ -

+

(+)-

Abb. 5. Häufigkeit und Stärkegrad einer Euglobulin-Trübungsreaktion in je 50 normalen, dysproteinämischen und paraproteinämischen Seren.

zunahme mit fallender Temperatur wesentlich größer als bei normalen Seren ist.

Besonders betont werden muß, daß die pathologischen Viskositätswerte der paraproteinämischen Seren keine Proportionalität zu den jeweiligen Serumgesamteiweißwerten aufweisen. Dies ist aus

Abb. 4 zu entnehmen, in der wir die 22 Viskositätswerte einer normalen Humanglobulinlösung von 6 8, 10 12 und 14 g / Konzentration eingezeichnet haben. Die Punkte liegen in der logarithmischen Skala auf einer Geraden die mit zunehmender Konzentration ansteigt. Als Einzelpunkte sind in der Abbildung alle pathologischen 22 Viskositätswerte paraproteinämischer Seren in Beziehung zu ihrem Gesamteiweißwert registriert. Das Fehlen einer Korrelation zwischen abnormer Viskosität und Serumeiweißwert ist ebenso deutlich, wie die individuell verschieden starke pathologische Viskositätserhöhung Diese muß also durch ein qualitativ abnormes Verhalten der Paraproteinfraktion bedingt sein.

D *Euglobulintest*

Ergänzend stellen wir den obigen Befunden die Ergebnisse des Euglobulintestes an den drei Serumkollektiven gegenüber Sie sind in Abb. 5 aufgezeichnet. In der *Normalgruppe* finden sich 11 schwach positive Reaktionen. Bei den *dysproteinämischen Seren* sind positive Reaktionen verschieden starken Grades relativ am häufigsten. Nur in 12 Fällen, also etwa einem Viertel der Fälle, fiel der Test negativ aus. Bei den *Paraproteinämien* ist etwas über die Hälfte (30) der Fälle positiv doch ist hier die Frequenz der quantitativ stärksten Reaktionen am größten. Unter Berücksichtigung der Normalserumbefunde können bei diesem Test nur stärkere Trübungen als eindeutig pathologisch bewertet werden.

E. *Kombination mehrerer Kältelabilitätsphänomene*

Nicht selten findet sich in einem und demselben Serum eine Kombination mehrerer Kältelabilitätsphänomene. Bei Dysproteinämien scheint die Kombination Kältepräzipitation plus minimale abnorme Kälteviskositätserhöhung öfter vorzukommen. Da die letztere jedoch nur im Mittelwert des Kollektivs erkennbar wird, ist eine individuelle zahlenmäßige Erfassung der Kombination nicht möglich.

Von den 58 untersuchten paraproteinämischen Seren zeigten 27 gleichzeitig mehrere Kältelabilitätsphänomene, und zwar 5 die Kombination Kältepräzipitation plus Kältegelifikation 22 die Kombination Kältepräzipitation plus abnorme Kälteviskositätssteigerung. Auf die Annahme einer Kombination von Kältegelifi-

kation plus abnorme Kälteviskositätserhöhung muß wegen der Unmöglichkeit einer methodischen Differenzierung verzichtet werden.

II Die qualitativen *phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen* ergaben die folgenden Resultate

A. Die *Kältepräzipitation* wurde an 20 dysproteinämischen und 10 paraproteinämischen Seren studiert, die bei der Abkühlung im Eiswasserbad nach kurzer Zeit oder innerhalb 24 Stunden verschieden starke, abzentrifugierbare, wärmereversible Trübungen ergeben hatten. Vorläufige Resultate sind schon an anderer Stelle mitgeteilt worden (7) Mikroskopisch sah man in den Objektträgerpräparaten dieser Seren nach Abkühlung auf +4 C teilweise schon innerhalb weniger Minuten, teilweise innerhalb einiger Stunden, zahlreiche winzige amorphe Pünktchen und/oder kleine Tröpfchen auftreten. Die Tröpfchen zeigten eine Tendenz, zu größeren Tropfen zusammenzufließen. Die winzigen Pünktchen pflegten zu kleinen korallenstockartigen Bezirken zu aggregieren. An diesen zunächst unregelmäßigen kleinen Bezirken war nach längerem Verbleib der Präparate in einer Umgebungstemperatur von +4 C nach 4 24 oder 72 Stunden zum Teil ebenfalls ein Konfluieren der winzigen Partikel zu beobachten, wobei entweder kleine homogene Tropfen entstanden, ähnlich den eben beschriebenen, oder abgerundete partiell homogenisierte Gebilde, die jedoch noch eine angedeutete feine Granulierung erkennen ließen. Bei einem Teil der Seren wurde eine eindeutige Homogenisierung der zahlreichen winzigen Partikel vermißt, wobei sich nicht sicher entscheiden ließ ob in diesen Fällen die relativ geringe Quantität der Partikel eine unzureichende Voraussetzung für eine Homogenisierung war oder ob ihnen überhaupt die Fähigkeit zum Konfluieren fehlte.

Wie wir schon früher diskutiert haben (6) scheint es verschiedene Typen der Entmischung kältelabiler Serumkomponenten zu geben. Einer dieser Typen besteht in einer unmittelbaren tropfigflüssigen Entmischung ein anderer in einer zunächst feinstkörnigen Entmischung mit Tendenz zum Konfluieren im Laufe mehrerer Stunden. Ob die Fälle mit nicht eindeutigem Konfluieren der winzigen Partikel einen dritten «amorph-soliden» Entmischungstyp darstellen, muß offen bleiben. Kein Zweifel kann daran bestehen, daß bei dem erstgenannten Typ sich die kälteunlösliche Serumfraktion primär in flüssiger Form abscheidet. Er lag eindeutig bei 6

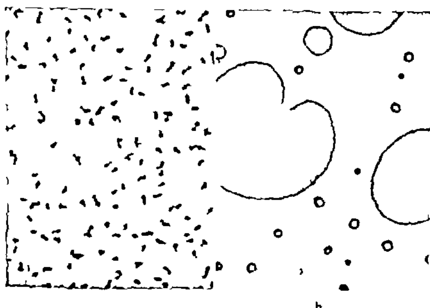


Abb. 6. Phasenkontrastmikroskopische Bilder einer paraproteinämischen Kältepräzipitation vom Typ der primär flüssigen Entmischung. a) Frühstadium ca. 2 Minuten nach Abkühlung des Serums. Zahlreiche kleine Tröpfchen. b) Spätstadium ca. 30 Minuten nach Abkühlung. Konfluieren der Tröpfchen zu größeren und großen Tropfen. Serum eines Patienten mit chronischer Kälteagglutininkrankheit. Ca. 920

unserer Fälle vor. Die Homogenisierung bei dem zweiten der geschilderten Typen spricht ebenfalls für einen flüssigen Aggregatzustand des in Kälte ausfallenden Serumanteils. Diese Variante haben wir in 6 verschiedenen Seren beobachtet. Nach wiederholten Kontrollen und Reproduktionen der Versuche möchten wir jedoch in Erweiterung unserer früheren Mitteilung die Möglichkeit eines feinstkörnig-soliden Entmischungstyps *ohne* eindeutige Tendenz zum Konfluieren (2 Fälle) nicht ausschließen. Doch konnte in diesen Fällen auch die relative Spärlichkeit der präzipitierten Partikel Grund für ihre mangelhafte oder fehlende Homogenisierung sein. Kristalloide Ausfällungen wie sie v. Bonsdorff *et al.* (1) sowie Holmberg und Grönwall (2) beschrieben, haben wir an unserem Beobachtungsgut nicht gesehen. Abb. 6 zeigt ein Beispiel für den primär flüssigen Entmischungstyp. Abb. 7 zeigt ein Beispiel für die feinstkörnige Entmischung mit sekundärer Homogenisierung.

Alle beschriebenen Varianten waren sowohl an den untersuchten dysproteinämischen wie auch an den paraproteinämischen

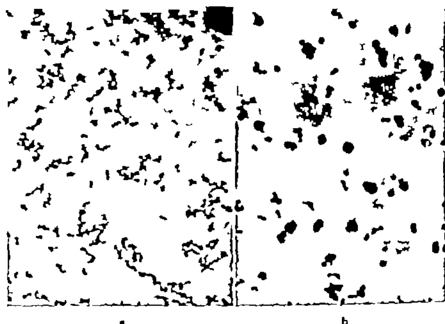


Abb. 7 Phasenkontrastmikroskopische Bilder einer paraproteinämischen Kältepräzipitation vom Typ der primär feinkörnigen Entmischung mit sekundärer Homogenisierung. Frühstadium ca. 10 Minuten nach Abkühlung des Serums. Korallenstockartige Aggregate der entmischten Partikel. b) Spätstadium ca. 48 Stunden nach Abkühlung. Konfluieren der Aggregate zu homogenen tropfenartigen Bezirken. Serum einer Patientin mit Makroglobulinämie. Ca. 320

Seren zu beobachten, an den letzteren jedoch mehrere Male quantitativ viel stärker ausgeprägt. Nach Erwärmen auf ca. 37° C war auch mikroskopisch eine vollständige Auflösung der entmischten Fraktionen im umgebenden Serum zu beobachten. Zwischen der Grundkrankheit und dem jeweiligen Entmischungstyp ergeben sich aus unserem bisherigen Beobachtungsgut keine eindeutigen Korrelationen.

B. Phasenmikroskopische Untersuchungen der *Kältegelfiltraten* konnten wir bisher an 3 paraproteinämischen Seren durchführen. Hier blieb, nachdem die Geltransformation zwischen Objektträger und Deckglas eingetreten war, das Gesichtsfeld zunächst homogen. Etwaige Strukturen waren phasenoptisch nicht faßbar. Im Laufe von ca. 30 Minuten bis zu mehreren Stunden traten bei konstant niedriger Temperatur jedoch spontan rundliche Lücken, Risse, Spalten und Brüche in der Gelmasse auf, die freie Flüssigkeit enthielten (Abb. 8a). Ähnliche Veränderungen ließen sich auch kurz

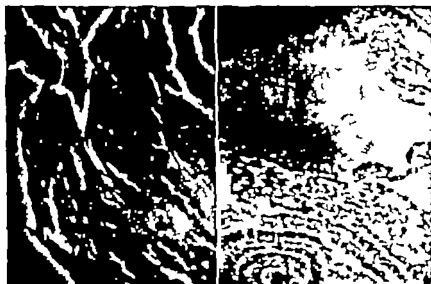


Abb. 8. Phasenkontrastmikroskopische Bilder eines paraproteinämischen Kältegels. a) ca. 4 Stunden nach Abkühlung durch spontane Retraktion der homogenen Gelmasse entstandene Brüche und Spalten. b) ca. 5 Minuten nach Abkühlung durch Druck auf das Deckglas künstlich erzeugte Zertrümmerung der homogenen Gelmasse. Serum einer Patientin mit Makroglobulinämie. Ca. 320

nach Eintritt der Kältegelbildung künstlich durch Druck auf das Deckglas erzeugen (Abb. 8b). Die Gelmasse ist nach einer gewissen Alterung oder nach mechanischer Läsion also offensichtlich zu einer Retraktion fähig, bei der ein anfangs nur passiv miteingeschlossener flüssig gebliebener Serumanteil freigesetzt wird. Die Brüche erinnern morphologisch an bröckelnde Gallerten. Bei Wiedererwärmung tauen die Gelmassen wie schmelzendes Eis ab.

C. Von den paraproteinämischen Seren mit stark *erhöhter Kälteviskosität* standen uns bisher 5 für phasenoptische Studien zur Verfügung. Es handelte sich um Seren, die nach Lagerung bei —30° C wieder aufgetaut worden waren, ihre abnorme viskose Eigenschaft aber in vollem Umfang behalten hatten. Sie zeigten, abgesehen von dem Nebenbefund spärlicher amorpher Pünktchen, die sich bei Erwärmung nicht auflösten, keine phasenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen, die als morphologisches Korrelat der Kältehyperviskosität hätten angesprochen werden können.

increased viscosity. *Water-labile serum proteins* presented either a liquid or fine granular, amorphous type of precipitation.

Résumé

Dans 50 sérums normaux, 50 sérums dysprotéinémiques et 58 sérums paraprotéinémiques, nous avons étudié quelles étaient la fréquence et les quantités relatives des protéines cryolabiles et hydrolabiles, et quelles étaient leurs caractéristiques à la microscopie à contrastes de phases. Une précipitation par le froid de différents degrés se trouva 36 fois dans les sérums dysprotéinémiques et 37 fois dans les sérums paraprotéinémiques, mais par contre dans aucun des sérums normaux. Une gélification par le froid se produisit dans 6 des sérums paraprotéinémiques. Une augmentation de la viscosité indépendante du taux des protides se trouva dans 30 des sérums paraprotéinémiques déjà à chaud et s'accentua dans le froid en partie de façon disproportionnée. Les protéines hydrolabiles furent mises en évidence dans 11 sérums normaux, 38 sérums dysprotéinémiques et 30 sérums paraprotéinémiques, ces derniers donnant les opacités relativement les plus fortes. Des observations faites au microscope à contrastes de phases montrèrent que la précipitation par le froid se faisait premièrement sous une forme de gouttes ou sous celle de grains amorphes qui souvent confluent par la suite. Les gels par le froid qui au début avaient un aspect homogène, présentèrent après vieillissement ou après des altérations mécaniques des déchirures et des fentes. Pour l'augmentation de la viscosité, nous n'avons pas trouvé d'équivalent morphologique. Les protéines sériques hydrolabiles sont précipités soit sous une forme fluide soit sous celle de grains amorphes.

Literatur

1 Bohmdorf B., Grotch, H. and Packalén T. On the presence of a high molecular crystallizable protein in blood serum in myeloma. Folia haemat. (Lpz.) 59 184 (1938)

2. Holmberg, C. G. och Grönwall, A. Ein neues krystallinisches Serumglobulin. Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 273 199 (1942)

3 Lerner, A. B. and Watson, C. J. Studies of cryoglobulins. Unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin). Amer. J. med. Sci. 214 410 (1947)

4 Riva, G. Das Serumeiweißbild. 2. Aufl., p. 349 (Huber, Bern 1963)

5 Scheurlen, H. und Klemm, D. Paraproteinämie mit ungewöhnlich thermolabiler Eiweißfraktion. Schweiz. med. Wschr. 93 646 (1963)

6. Scheurlen, H. und Klemm, D. Kältelabilitätsphänomene bei Paraproteinämien. Med. Klin. 59 553 (1964)

7 Schwaboth, H., Klemm, D. und Betz, E. Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen an Kryopräzipitaten paraproteinämischer und dysproteinämischer Seren. Schweiz. med. Wschr. 94 1580 (1964)

8. Waldenström, J. Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia. A new syndrome. Acta med. scand. 117 216 (1944)

9 Wintrobe, M. M. and Buell, M. V. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. With report of a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. Bull. Johns Hopk. Hosp. 52 156 (1933)

Adresse der Autoren: Dr. H. Schwaboth, Dr. S. Raps und Dr. D. Klemm, Abtlg. für klinische Immunpathologie, Med. Univ.-Klinik, *Freiburg i. Br.*, Deutschland

Acta haemat. 34 175–186 (1965)

I. und II. Innere Klinik der Medizinischen Universität Szeged

Untersuchung der Thrombocytopoese bei Perniciosa Kranken

Von K. Rák, F. Krizsa, L. Varga und I. Cserháti

Es ist seit langem bekannt, daß bei den megaloblastären Anämien, so auch bei der durch Vitamin B_{12}-Mangel bedingten Perniciosa eine komplexe Störung der Hämopoese vorliegt. Außer der Anämie ist auch eine Verminderung der weißen Blutzellen und der Thrombocyten nachweisbar. Die Thrombocytopenie offenbart sich nicht selten in einer Blutungsneigung. Die richtige Behandlung, d.h. Vitamin B_{12}-Verabreichung, hat eine Normalisierung aller drei blutbildenden Systeme zur Folge.

Bei gewissen Fällen von pathologischer Thrombocytopoese ist mit Hilfe des Mäuse-Testes im Serum ein die Thrombocytenbildung stimulierender Faktor nachzuweisen (2, 3, 6, 7). Die Untersuchung dieser im Jahre 1958 von Kelemen u. Mitarb. (2) beschriebenen Serumaktivität bei der Perniciosa war indiziert, weil dieser Mangelzustand mit einer tiefgreifenden, aber reversiblen, gut beeinflußbaren Störung der Thrombocytopoese einhergeht, und weil einige frühere Beobachtungen auf die Möglichkeit humoraler Beziehungen zwischen Erythrocyten- und Thrombocytenbildung aufmerksam gemacht haben.

In unserem bisherigen Material war in einem bedeutenden Prozentsatz der Kranken mit dieser Aktivität das Knochenmark hyperzellulär und gewöhnlich die Erythropoese ausgesprochen gesteigert, wie bei den Polycythämien, Hypersplenien und einigen Fällen von di Guglielmo-schem Syndrom (7). Wir begannen zu untersuchen, ob bei der Perniciosa die ausgesprochene Knochenmarkhyperplasie und hämopoetische Zelltätigkeit nach Vitamin B_{12}-Zufuhr hinsichtlich der Thrombocytopoese von einer nennenswerten humoralen Veränderung begleitet sind. Da wir in einigen

Fällen ein gut reproduzierbares Phänomen beobachteten, haben wir die Beziehungen zwischen dem Verlauf der Thrombocytenzahl und der Serumaktivität von Perniciosa Kranken in der ersten Phase der Vitamin B_{12}-Behandlung eingehender untersucht.

Untersuchungsmaterial und Methoden

Während der vergangenen zwei Jahre haben wir die Thrombocytopoese von 10 unbehandelten Perniciosa-Kranken untersucht, nur einer von ihnen hatte vor Jahren Vitamin B_{12} erhalten. Bei sämtlichen Patienten lag die Erythrocytenzahl unter 2,0 Millionen. Die Kontrolluntersuchungen fanden an Individuen ohne hämatologische Abweichungen statt. Zu Beginn der B_{12}-Therapie wurde vor und zu bestimmten Zeitpunkten nach der ersten Injektion die Thrombocytose verursachende Aktivität des beim nüchternen Patienten entnommenen Serums im Mäusetest untersucht. Von den zu prüfenden Sera erhielten Gruppen von 5 Mäusen 0,5 ml pro Tier intraperitoneal injiziert. Die Thrombocytenzahl der Tiere wurde aus dem Schwanzblut vor der Injektion, sowie 3 und 5 Tage nachher bestimmt. Als maßgebend wurden die entsprechenden Veränderungen betrachtet und die Durchschnittswerte pro Mäusegruppe errechnet. Zur Thrombocytenzählung bedienten wir uns der direkten phasenkontrastmikroskopischen Methode von Feissly und Lüdin (1). Als positive Wirkung wurden durchschnittliche Erhöhungen der Thrombocytenzahl um mehr als 30% betrachtet.

Die Fraktionierung der menschlichen Serumproteine erfolgte mittels Agarel-Elektrophorese. Im Anschluß an die wegen des Veronalgehaltes nötige Dialyse wurde die Reinheit der Fraktionen immunoelektrophoretisch nach der Grabar-Williamschen Technik in der Modifikation von Scheidegger kontrolliert (8).

Ergebnisse

Die wichtigsten klinischen und Laboratoriumsdaten der Perniciosa Kranken sind in Tabelle I zusammengefaßt. Außer der Perniciosa lagen im 3. Falle ein Darm Karzinoid und im 7. und 8. Falle eine generalisierte Arteriosklerose vor. Das Knochenmarksbild war in sämtlichen Fällen megaloblastär und (mit Ausnahme des 2. und 3. Falles) typisch. In den Fällen 2 und 3 war die Reifungshemmung nur mäßig und es bestanden beträchtliche erythropoietische Hyperplasie und lebhafte Zellteilung. Abgesehen von dem zweiten Fall hatten alle Patienten vor der Behandlung eine Thrombocytopenie. Obzwar bei den ersten 7 Patienten die Zahl der Thrombocyten nach der Behandlung nur vereinzelt untersucht wurde, war bei vier eine Vermehrung festzustellen. Bei drei Fällen fanden systematische Thrombocytenzählungen statt. Tabelle I veranschaulicht auch das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchung des Serums der Kranken im Mäusetest. Mit Ausnahme des dritten Falles war das vor der Behandlung gewonnene Serum in jedem Falle negativ. Das 48 Stunden nach der ersten Behandlung (20–300 µg Vitamin B_{12}) entnommene Serum dagegen hatte

Tabelle I
Einige klinische und Laboratoriumsbefunde der Perniciosa-Kranken

…me …schlecht …r	Klinische Diagnose	Knochenmark	Thrombocytenzahl vor Behandlung	nach	Die Mitose-Thrombocytose verursachende Aktivität des Serums
J. ♀ J.	Anaemia perniciosa	typisch	100 000	165.000 (am 6. Tage)	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 120 µg B_{12} am 3. Tage + 60%
J. ♂ J.	Anaemia perniciosa	Megaloblastose, mäßige Reifehemmung	170.000	—	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B_{12} am 3. Tage + 40%, am 5. Tage erneut 300 µg, Serumwirkung am 5. Tage + 36%
J. ♀	Anaemia perniciosa, Carcinoid	Megaloblastose, mäßige Reifehemmung, lebhafte Erythropoese	—	—	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung am 3 Tage + 32% ! 48 Std. nach der Injektion von 300 g B_{12} am 3. Tage + 26%
L. L. ♀	Anaemia perniciosa	typisch	100.000	190.000 (am 6. Tage)	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg. 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B_{12} am 3. Tage + 56%
J. ♀	Anaemia perniciosa	typisch	115.000	—	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg., 48 Std. nach der Injektion von 300 µg B_{12} am 3. Tage + 63%
.R. ♀	Anaemia perniciosa	typisch	80,000	160.000 (am 5. Tage)	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg. 48 Std nach der Injektion von 20 µg B_{12} am 5. Tage + 48% 48 Std. nach am 3. Tage verabr. 300 µg am 5 Tage + 34%
L. F ♀	Anaemia perniciosa, Arteriosklerose	typisch	95,000	210.000 (in der 4 Woche)	Vor der Vitamin B_{12} Behandlung neg., 48 Std. nach der Injektion von 60 µg B_{12} am 3. Tage + 70%
J. ♂	Anaemia perniciosa, Arteriosklerose	typisch	75,000	390.000 (Max. am 14. Tage)	
P ♀	Anaemia perniciosa	typisch	60,000	800.000 (Max. am 14. Tage)	siehe Abbildungen 1, 2 und 3
J. ♀	Anaemia perniciosa	typisch	70,000	350 000 (Max. am 13. Tage)	

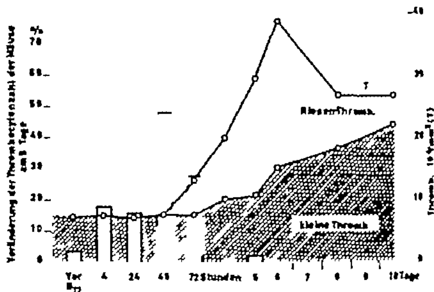


Abb. 1 Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 60 µg Vitamin B_{12} bei Fall Nr. 8.

eine wesentliche Erhöhung der Thrombocytenzahl zur Folge, die mit Ausnahme von Fall 3 mehr als 30 % (40–70 %) betrug mit einem Höchstwert am 3. bzw. 5. Tage. Im Fall 3 bestand vor der Behandlung eine mäßige Serumpositivität, die nach Zufuhr von 300 µg Vitamin B_{12} nicht mehr nachweisbar war. Die Veränderungen der Thrombocytenzahl und der Serumaktivität der Patienten 8, 9 und 10 sind in Abbildung 1, 2 und 3 dargestellt. Die Säulen stellen die im Mäusetest beobachtete Wirkung der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Sera dar. Bezogen auf den Ausgangswert, sowie die 4 und 24 Stunden nach der Vitamin B_{12}-Injektion gewonnenen Werte betrug die am 5. Tage beobachtete Veränderung unter 20 %. Die 48-Stundenwerte waren auffallend hoch, und die in Fall 8 und 9 untersuchten 72-Stundenwerte bewegten sich um +30 %, während die am 5. Tage erhaltenen Sera schon keine Aktivität mehr besaßen. Die Aktivität des 48-Stundenserums des Patienten Nr. 9 war mit Trypsin aufzuheben. Die Abbildungen geben die Zahl und die Größe der kreisenden Thrombocyten wieder, indem zwischen normal großen, d.h. den üblichen kleinen Thrombocyten und Elementen, die oft das 4 bis 5-fache der normalen Größe erreichen und entweder rund und oder unregelmäßige Konturen aufweisen (große Thrombo-

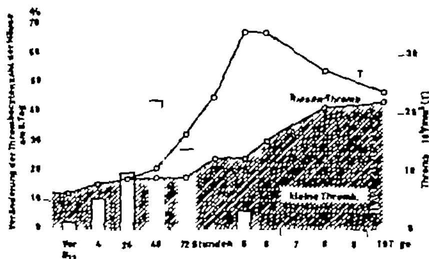


Abb. 2. Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 60 µg Vitamin B_{12} bei Fall Nr. 9.

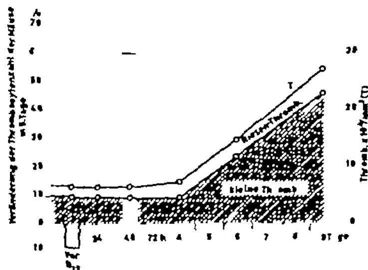


Abb. 3. Thrombocytenzahl und Serum-Aktivität nach Verabreichung von 60 µg Vitamin B_{12} bei Fall Nr. 10.

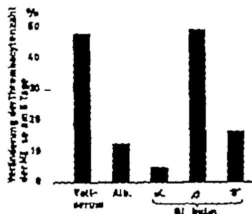


Abb. 4 Wirkung des 48 Stunden nach der Verabreichung von 60 µg Vitamin B_{12} beim Fall Nr. 8 gewonnenen Serums, bzw. seiner Eiweißfraktionen auf die Thrombocytenzahl von Mäusen.

cyten) unterschieden wird. In Fall 10 waren die großen Thrombocyten in geringer Zahl auch schon vor der Behandlung zu beobachten, und haben nach der Behandlung nicht zugenommen. Bei den Patienten Nr. 8 und 9 waren für die beträchtliche frühe Zunahme der Thrombocyten insbesondere diese Zellen verantwortlich, während die Vermehrung der als normal beurteilten Thrombocyten nur allmählich einsetzte. (Eine ähnliche Erscheinung sahen wir schon früher, z. B. nach wegen Thrombocytopenie vorgenommener Splenektomie bzw. bei Prednisolonbehandlung in der Phase der Erhöhung der Thrombocyten.) Bei den drei eingehend untersuchten Fällen war das Maximum am 13. bzw. 14. Tage zu beobachten, wobei die meisten Thrombocyten die kleine regelmäßig-runde Form aufwiesen.

Abbildung 4 veranschaulicht die Wirkung des 48 Stunden nach der Behandlung mit 60 µg Vitamin B_{12} vom Patienten Nr. 8 erhaltenen Serums, bzw. seiner Eiweißfraktionen. Das Vollserum und seine β-Globulinfraktion zeigten nahezu die gleiche Aktivität (+ 48 bzw. + 49%), während die übrigen Fraktionen sich als unwirksam erwiesen. Es wurden auch die 72 Stunden-Serumfraktionen des Kranken Nr. 9 untersucht. Hier hatte das Vollserum eine Aktivität von + 28% und die β-Globuline eine solche von + 40%. Das 48-Stunden-Vollserum des Patienten Nr. 10 bewirkte

eine Erhöhung der Thrombocytenzahl um + 60 % und die β-Globulinfraktion um + 38 %.

Zur Kontrolle wurde die Serumaktivität von Perniciosa-Kranken mit totaler klinischer und hämatologischer Remission vor und nach Zufuhr neuer Vitamin B_{12}-Dosen geprüft. Das Serum des Patienten Nr. 7 erwies sich bei der Untersuchung während der Remission vor und 48 Stunden nach der Injektion von 60 µg Vitamin B_{12} im Mäusetest als unwirksam. Ähnlich negativ wurde das Serum eines behandelten, in diesem Material nicht angeführten Perniciosakranken 48 Stunden nach der Verabreichung von 300 µg Vitamin B_{12} befunden. Das Serum von zwei hämatologisch normalen Individuen zeigte vor bzw. 4 und 48 Stunden nach Zufuhr von 60 µg Vitamin B_{12} keine Thrombocytose auslösende Aktivität.

Schließlich wurde die Thrombocytenzahl der Mäuse am 3. und 5. Tage nach der i.p. Injektion verschieden hoher Dosen Vitamin B_{12} kontrolliert. 2,0–15,0 µg hatten höchstens eine mäßige Erhöhung zur Folge. Die maximale Erhöhung war nach Verabreichung von 2,0 µg zu verzeichnen, Veränderungen von über +30 % waren in keiner einzigen Gruppe feststellbar.

In Anbetracht des Phenolgehaltes der Vitamin B_{12}-Präparate wurde auch die Wirkung von 0,5 ml 0,1 %iger Phenollösung auf die Thrombocytenzahl der Maus untersucht; eine nennenswerte Änderung war bis zum 5. Tage nicht zu beobachten.

Besprechung

Die *Thrombocytopenie sowie die qualitativen und quantitativen Anomalien der Megakaryocyten Perniciosa-Kranker sind bekannt* (11). Bei megaloblastären Anämien, so vor allem bei der Perniciosa, kann klinisch die durch die Thrombocytopenie bedingte Blutungsneigung im Vordergrund stehen (9). Die quantitativen, und vor allem die qualitativen Veränderungen der Thrombocyten nach der ersten wirksamen Vitamin B_{12}-Dosis sind weniger genau untersucht. Nach Smith und Mitarb. (9) tritt die anfängliche Plättchen-Erhöhung mehr oder minder simultan mit der Retikulocytenkrise auf. Untersuchungen über begleitende, das Thrombocytensystem betreffende humorale Erscheinungen sind uns nicht bekannt.

Die Seren der 10 Perniciosa Kranken waren vor der Vitamin B_{12}-Behandlung im Mäusetest wirkungslos. Die Thrombocytose hervorrufende Serumaktivität geht fast regelmäßig dem auf die Behandlung folgenden Thrombocytenanstieg voran. Sehr gut zu beobachten war dieser Zusammenhang in unseren drei letzten Fällen Eine Ausnahme bildete nur ein Fall, wo die Beurteilung durch eine Begleitkrankheit gestört war

Um die Frage nach dem Zusammenhang der Vitamin B_{12}-Wirkung mit der Thrombocytopoese zu beantworten, muß geklärt werden, ob das Vitamin B_{12} unter physiologischen Bedingungen das Thrombocytensystem beeinflußt. Auf Grund orientierender Kontrolluntersuchungen ist dies nicht der Fall. Hämatologisch gesunde Personen und in der Remission befindliche Perniciosa Kranke reagieren auf die Vitamin B_{12}-Gabe nicht in gleicher Weise wie unbehandelte Perniciosa Kranke. Bei Mäusen haben verschieden hohe Dosen von Vitamin B_{12} keine signifikante Veränderung der Thrombocytenzahl zur Folge. Es ist daher unwahrscheinlich, daß bei unseren Untersuchungen mit einer Wirkung des mit dem Serum übertragenen Vitamin B_{12} gerechnet werden muß. Es ist zu vermuten, daß der beobachtete Vitamin B_{12}-Effekt nur bei pathologischer Thrombocytopoese zur Geltung kommt, und auch hier in erster Linie bei pathologischer Thrombocytenbildung infolge eines Vitamin B_{12}-Mangels wie bei der perniciösen Anämie. (Unsere Beobachtungen schließen die Möglichkeit nicht aus, daß dieses Vitamin auch bei anderen Störungen der Thrombocytopoese wirksam ist)

Ferner stellt sich die Frage, wie die Thrombocytose verursachende Aktivität des Serums erstmal behandelter Perniciosa Kranker sich zu der bisher untersuchten, in hämatologischem Krankengut scheinbar einheitlichen thrombocytopoetischen Serumaktivität verhält. Nach orientierenden Untersuchungen besteht darwischen kein Unterschied. Die aktive Substanz ist in der β-Globulinfraktion enthalten, sie ist nicht dialysierbar und bei Mäusen ist der maximale Anstieg der Thrombocytenzahl ebenfalls am 5 Tage zu beobachten.

Hängt die durch Vitamin B_{12} bedingte Veränderung der Thrombocytenzahl mit der vorübergehend nachweisbaren thrombocytopoetischen Aktivität des Serums zusammen? Die Beantwortung dieser Frage würde gleichzeitig den Einfluß von Vitamin B_{12}

auf die pathologische Thrombocytopoese Perniciosa Kranker er klären. In erster Linie kommen drei Möglichkeiten in Frage, die in Abb. 5 dargestellt sind.

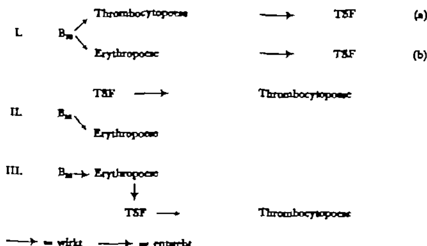


Abb. 5

I Bei Mangel an Vitamin B_{12} ist in Anbetracht der gestörten DNA-Synthese die Reife und Teilungsstörung der DNA-syntheti sierenden Zellen des Magakaryocytensystems und des Präkursoren systems wohl zu erklären. Bei Zufuhr des fehlenden Faktors wird das Gleichgewicht – ohne Mitwirkung irgendeines humoralen Fak tors – wiederhergestellt und vermutlich gleichzeitig auch die Ery thropoese wieder in die richtige Bahn gelenkt. Alldem geht eine intensive Zelltätigkeit beider Systeme voraus, und es ist vorstellbar daß der Thrombocytose-stimulierende Faktor (TSF) das Produkt dieses Vorganges ist. Er kann ein humorales Nebenprodukt der Thrombocytopoese (a) aber auch der Erythropoese (b) sein. Nach dieser Vorstellung besitzt der TSF bei der Erhöhung der Thrombocytenzahl Perniciosa Kranker keine kausale Rolle.

II Das Vitamin B_{12} führt außer seiner Wirkung auf die Ery thropoese auf bisher unbekannte Weise und von unbekanntem Orte aus auch eine Freisetzung von TSF Das Auftreten der Akti

vität ist nach einer gewissen Zeit von einer Erhöhung der Thrombocytenzahl gefolgt. Hier erhebt sich u. a. auch die Frage, ob diese Vorstellung mit den bisherigen Kenntnissen über die Dynamik der Thrombocytopoese vereinbar ist. Wenn die Wirkung des Poetins irgendeines Blut Zellsystems auf der Stufe der sog Urzellen (stem cell) zur Geltung kommt – wie es vor allem mit Bezug auf das erythropoetische System auch LAJTHA (5) annimmt – so muß zwischen dem Erscheinen der Aktivität und der Veränderung der Zellzahl ein gewisses – in Tagen auszudrückendes – Intervall bestehen. In diesem Sinne würde die frühe periphere Wirkung nicht das Ergebnis eines Poetin-Stimulus sein. Bei zwei Perniciosa Kranken war am Tage nach dem Nachweis der Aktivität die Thrombocytenzahl schon wesentlich erhöht, und am 4 Tage darauf hatte die Thrombocytose bereits ihr Maximum erreicht (Abb. 1 und 2) Für die Thrombocytenvermehrung sind aber jugendliche, unregelmäßige, als pathologisch zu betrachtende große Plättchen verantwortlich und die Vermehrung der üblichen, sog kleinen Thrombocyten setzt erst am 3 bis 4 auf das Aktivitätsmaximum folgenden Tage ein. Beim dritten Fall (Abb 3) bestand in den ersten 48 Stunden überhaupt keine Thrombocytenvermehrung dabei ist ein Intervall von mindestens 48 Stunden nach der Vitamin B_{12}-Injektion in jedem Falle zu beobachten. Da man heute im Bereich der Erythropoese unter dem Einfluß des Erythropoetins auch eine unregelmäßige Zellteilung sog 'skipped division vermutet (10) ist es andererseits möglich, daß die innert drei Tagen erscheinenden großen Thrombocyten nicht unmittelbar von Urzellen abstammen, bzw nicht Produkte des normalen, sondern des stimulierten Reifeprozesses sind. Ähnliche Frühreaktionen sind wir bereits auch in Verbindung mit der medikamentösen (Prednison) Beeinflussung von ITP Fällen, bzw im Anschluß an Splenektomien begegnet, d.h. in Situtationen, wo eine Neubildung dieser Zellen schwer zu leugnen gewesen wäre. Diese zweite Theorie schreibt also dem TSF beim Zustandekommen der Thrombocytose eine ätiologische Rolle zu.

III Die Thrombocytose hervorrufende Aktivität des Vitamin B_{12} ist endlich auch als eine Wirkung auf das erythropoetische System denkbar Die Richtigkeit dieser Annahme würde den bei Krankheiten des erythropoetischen Systems beobachteten Nachweis des TSF erklären. Obzwar – wie eingangs erwähnt – die vorliegende Untersuchungsreihe wenigstens teilweise einer solchen

Vorstellung zu verdanken ist, erscheint diese dritte Theorie doch am wenigsten gestützt.

Vor den auf verschiedene Weise hervorgerufenen akuten Mäuse-Thrombocytosen, sowie vor den Thrombocytenzahlerhöhungen verschiedener Pathogenese beim Menschen zeigt das Serum fast regelmäßig eine Thrombocytose verursachende Aktivität (4). Auch die hier vorliegende Beobachtung zeigt diesen Befund.

Es scheint angebracht, die Wirkung des Vitamin B_{12} über die perniciöse Anämie hinaus auch in Fällen andersartiger Störungen der Thrombocytopoese zu untersuchen.

Zusammenfassung

Es wurde die Thrombocytopoese an zehn unbehandelten Perniciosa-Kranken in der ersten Phase der Vitamin B_{12}-Behandlung untersucht. Das Serum der Kranken war vor der Behandlung im Mäusetest negativ, während es 48 (und in geringerem Grade 72) Stunden nach der ersten wirksamen Vitamin B_{12}-Dosis eine Thrombocytose auslöste. Zu einem späteren Zeitpunkt war diese Aktivität nicht mehr nachweisbar. Die Thrombocytenzahl der Kranken begann anzusteigen am Tage, nachdem die Aktivität nachzuweisen war. Die Eigenschaften der Aktivität stimmen überein mit denjenigen des thrombopoetischen Serumfaktors, der an einem hämatologischen Krankengut zuvor beobachtet worden war. Wahrscheinlich beeinflußt das Vitamin B_{12} nur die pathologische Thrombocytopoese bei Mangelzuständen. Ob dem Thrombocytose bewirkenden Faktor bei der auf die Behandlung folgenden Erhöhung der Thrombocytenzahl eine kausale Rolle zukommt, bleibt vorerst unentschieden.

Summary

Thrombocytopoiesis was studied during the first stage of vitamin B_{12} treatment in ten previously untreated patients with pernicious anaemia. While the patients' serum was negative before treatment according to the mouse test, 48 and, to a lesser extent, 72 hours after the first effective dose B_{12} it produced a thrombocytosis. This activity was no longer demonstrable at a later stage. The patients' platelet count began to rise the day after this activity was first seen. The properties of this activity agree with those of the thrombopoietic factor found in the serum of haematological patients previously. Vitamin B_{12} evidently only affects pathological thrombopoiesis in the presence of deficiency. It is not yet clear whether the factor promoting thrombocytosis is responsible for the increase in platelet count following the treatment.

Résumé

Nous avons étudié la thrombocytopoïèse de malades atteints d'une anémie pernicieuse durant la première phase du traitement à la vitamine B_{12}. Le sérum de ces malades était négatif avant le traitement. 48 heures, et à un moindre degré 72 heures, après la première dose effective de vitamine B_{12}, il provoqua une thrombocytose. Après un cer

tain laps de temps, cette activité n était plus démontrable. Le nombre des thrombocytes augmenta le jour suivant celui où l'activité put être démontrée. Les propriétés de cette activité correspondent à celle du facteur thrombocytopoïétique sérique qui été observé au préalable chez des malades atteints d'affections hématologiques. La vitamine B_{12} n'influence probablement que la thrombocytopoïèse pathologique dans les états déficitaires. La question de savoir si le facteur provoquant la thrombocytose joue un rôle dans l'augmentation du nombre des thrombocytes, lors de la thérapie, reste pour le moment en suspens.

Literatur

1 Fischer, W. und Gerber, W. D.: Über eine einfache Methode der direkten phasenoptischen Thrombozytenzählung. Röntgen-Lab. Praxis *10:* 49 (1957).

2. Kelemen, E., Cserháti, I. and Tanos, B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. Acta haemat. *20:* 350 (1958).

3. Kelemen, E.; Lehoczky, D.; Perkedy, J.; Cserháti, I. and Rák, K.: Serum thrombocytopoietic activity in idiopathic thrombocytopenic purpura. Lancet *i:* 1134 (1960).

4 Kelemen, E.; Lehoczky, D.; Cserháti, I.; Kriza, F. and Rák, K.: Demonstrability of a serum factor inducing thrombocytosis prior to acute rises of platelets in mice and men. Acta haemat. *29:* 16 (1963).

5. Lajtha, L. G. and Oliver, R. Studies on the kinetics of erythropoiesis; in Haemopoiesis, Cell Production and its Regulation (Churchill, London 1960).

6. Rák, K. The humoral regulation of platelet production. Acta med. hung. *19:* 67 (1963).

7 Rák, K., Lehoczky, D., Kriza, F., Cserháti, I. und Kelemen, E.: Über die Thrombozytose verursachende Wirkung des Serums hämatologischer Kranker bei Männern. Folia haemat., N. F. *7:* 8 (1963).

8. Rák, K., Varga, L., Kriza, F. und Cserháti, I.: Die Wirkung von Eiweißfraktionen normaler menschlicher Sera auf die Thrombocytenzahl der Maus. Experientia *19:* 136 (1963).

9. Smith, M. D.; Smith, D. A. and Fletcher, M. Haemorrhage associated with thrombocytopenia in megaloblastic anaemia. Brit. med. J. *i:* 982 (1962).

10. Stohlman, F. Erythropoiesis. New Engl. J. Med. *267:* 342, 392 (1962).

11 Wintrobe, M. Clinical Hematology (Lea & Febiger, Philadelphia 1961).

Adresse der Autoren: Drs. K. Rák, F. Kriza, L. Varga und I. Cserháti, I. und II. Innere Klinik der Med. Univ.-Klinik, Szeged (Ungarn).

Acta haemat. 34 187 192 (1965).

Divisione Medica Talamona, Ospedale Maggiore, Milano
(Head Prof Livio Busi)

Acquired Idiopathic Hypoprothrombinaemia*

Acquired Hy[illegible] Secondary to Selective Deficient Absorption of Vitamin K

By F de Cataldo

Acquired hypoprothrombinaemia with a severe haemorrhagic diathesis may occur as a consequence of vitamin K deficiency in otherwise normal patients (1 2 3) In the previously recorded cases the vitamin K deficiency could not be referred to any of the known causes and its pathogenesis was obscure. The purpose of this paper is to report the case history of a patient with severe haemorrhages secondary to a combined deficiency of factor II (prothrombin) factor X (Stuart Prower) factor IX (PTC) and probably factor VII (proconvertin) Clinical and laboratory data seem to indicate a selective deficient absorption of vitamin K.

Case Report

The patient is a 43 year old female. At the age of 20 she had pulmonary tuberculosis with pleural effusion; she suffered tuberculous spondylitis at the age of 22 and recurrence of the pulmonary process at the age of 35.

The only bleeding episodes in her past history are frequent epistaxis until she reached the age of eight and occasional bleeding from the gums. At the age of 14 she underwent tonsillectomy; at 17 bilateral inguinal herniorraphy; at 29 colecystectomy; at 30 appendectomy at 32 removal of a polyp from the genital tract at 33 excision of varicose veins, at 41 splenectomy (we have not been able to ascertain why the latter operation was performed) It is very significant that none of the operations were complicated by haemorrhage.

In October 1962 the patient had an episode of thrombophlebitis on the left leg and received a short term treatment with an anticoagulant (Sintrom) complicated by numerous ecchymoses, bleeding from the gums, haematuria and hypoprothrombinaemia.

On March 3rd 1963 the patient was admitted to our department because of the persistent hypoprothrombinaemia and related haemorrhagic manifestations. Appetite, digestion and bowel function had always been normal.

---

* An abstract of this paper has been presented at the meeting of the "Società Italiana di Ematologia" on June 12th, 1964 in Milan.

On admission physical examination showed a well developed and well nourished female in no acute distress. Several ecchymotic areas were noted on the limbs. Palpation of the abdomen did not elicit pain or discomfort. Liver was not palpable. The scars of the previous surgical procedures were evident. The examination did not reveal other abnormal findings.

Routine laboratory tests: Haemoglobin 15 g per 100 ml; red cells 4.3 millions per cu. mm., packed cell volume 42% reticulocytes 0.5%. Leucocytes count 7000 per cu mm with a normal differential count. Urinalysis revealed numerous red blood cells in the sediment without other abnormal findings tests for occult blood in the stools were negative.

Table I

Correction of patient one stage prothrombin time Russel' Viper Venom (Stypven) as indicated.

Mixtures		Clotting time in seconds
Normal plasma		13
Patient' plasma		94–100
Patient plasma $BaSO^4$-treated Bovine plasma	0.8 cc 0.2 cc	95–100
Patient' plasma Aged normal Human serum	0.8 cc 0.2 cc	20
Patient' plasma Normal plasma	0.8 cc 0.2 cc	16
Normal plasma	(Stypven)	14
Patient' plasma	(Stypven)	37–42

Blood coagulation studies: Clotting time (Lee and White) 15 minutes clotting time in silicone 60 minutes (normal 35–45 minutes); bleeding time (Duke) 3 minutes platelet count 250 000 per cu mm. Clot retraction complete retraction in two hours at 37 °C. One stage prothrombin time 100 seconds (normal 13 seconds) prothrombin consumption 90% plasma prothrombin concentration 25% (Owren and Aas). Correction experiments were carried out in order to characterize the deficit responsible for the prolonged one stage prothrombin time (table I).

The results of the thromboplastin generation test with cross experiments with the serum from a known case of factor IX deficiency are recorded in table II.

The patient was then started on vitamin K_1 (Konakion-Roche) 10 mg intravenously daily for 10 days. The one stage prothrombin time performed after treatment was 14 seconds. The thromboplastin generation test was normal. It was evident at this point that the hemorrhages were secondary to acquired hypoprothrombinaemia secondary to vitamin K deficiency. Further studies were undertaken to clarify its etiology.

Table II

Thromboplastin Generation Test

Al $(OH)_3$-treated plasma	N	P	N	P	N	P
Serum	N	P	N	N	P	X
Platelet suspension	N	P	P	P	N	P
Substrate plasma	N	P	N	N	N	N
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	28	—	—
3	$42^{5}/_{10}$	—	—	13	—	—
4	26	—	38	10	—	—
5	$14^{5}/_{10}$	—	19	8	—	35
6	$11\ ^{5}/_{10}$	—	15	8	—	33
7	9	31	12	8	38	$23^{5}/_{10}$
8	9	24	11	8	36	17
9	$8^{5}/_{10}$	21	11	8	37	$16^{5}/_{10}$
10	9	17	11	8	37	—

N = normal P = patient; X = mixture of equal parts of patient's serum and factor IX deficient serum.

Liver function tests: Serum bilirubin 0.4 mg per 100 ml cholesterol 260 mg per 100 ml, bromsulphalein retention 6% at 30 minutes and 2% at 45 minutes. Takata, Mac Lagan and Kunkel's reactions negative. Total serum proteins 6.7 g per 100 ml albumin 3.94 g per 100 ml; α_1-globulin 0.22 per 100 ml α_2-globulin 0.67 per 100 ml β-globulin 0.85 per 100 ml; γ-globulin 1.02 per 100 ml.

Chest X-ray and digestive tract series were normal.

Bone marrow examination showed that all series were normally active.

Schilling test was performed administering to the patient 1 $\mu\gamma$ of Co^{60}-labelled vitamin B_{12}, urinary excretion 14,8%.

I^{131}-labelled triolein test: The test was performed administering to the patient 50μc of I^{131}-labelled triolein, diluted in 50 ml of milk. Thyroid uptake of I^{131} was blocked over the test-period by the daily administration of 20 drops of Lugol' iodine. Stools were collected for 5 days. The stool specimens were adjusted to standard weight with water and homogenized in shaker. The standard solution and the specimens were assayed in well-type scintillation counter I^{131}-triolein excretion in feces: 1,35%.

On April 24th 1963 the patient was discharged to be followed at in the out patient clinic and the treatment was discontinued. The patient returned to the out-patient haematology clinic on November 2nd 1963. The one stage prothrombin time was 32%. No signs of haemorrhage were noted and it was decided to restart the oral treatment (Konakion 20 mg daily). On November 23rd. 1963 the one stage prothrombin time was 30% of the normal control. It raised to 100% following intravenous treatment (Konakion 10 mg daily) Upon discontinuance of Konakion the one stage prothrombin time returned to the previous low level. Oral administration of the hydrosoluble form of vitamin K was also effective in raising and maintaining the one stage prothrombin time in a normal range.

Discussion

Thus the patient has a combined deficiency of factor II (prothrombin) factor IX (PTC) factor X (Prower-Stuart) and probably factor VII

The deficiency of factor II is demonstrated by the correction of the patient s prothrombin time (100 seconds) obtained by the addition of normal plasma (16 seconds) the quantitative assay of prothrombin by the method of OWREN AAS was 25 / of the normal.

Bovine plasma absorbed with $BaSO_4$ failed to correct the patient s one stage prothrombin time. Factor V (accelerator globulin) was therefore considered normal.

Deficiency of factor X is demonstrated by the prolonged one stage prothrombin time performed using Russel's viper venom and lipoid and by the abnormal thromboplastin generation test.

The possibility of factor IX (PTC) deficiency was also taken into consideration.

In table II the result of the thromboplastin generation test using a mixture of the patient s serum with the serum of a known case of factor IX deficiency is reported. It is evident that no correction could be expected in the thromboplastin generation test of the factor IX deficient patient substituting his serum with the serum of the patient under discussion. The platelets and the absorbed plasma of our patient showed normal clotting activity The incomplete correction obtained may be explained by a deficiency of both serum factors involved in the generation of intrinsic thromboplastin. In fact if our patient was lacking exclusively factor X, the mixture with factor IX deficient serum should have caused almost complete correction in the thromboplastin generation test. The experiment shows that when normal serum was used the minimum clotting time

was 8 seconds with the mixture the minimum clotting time was 16 seconds and 6/10

It is difficult to prove factor VII deficiency in this case because of the concomitant deficiency of factor X. Unfortunately a factor VII deficient plasma was not available.

The hypoprothrombinaemia has been corrected either by the intravenous administration of vitamin K_1 or by oral administration of the hydrosoluble form. The oral treatment with vitamin K_1 has been *uneffective. The behavior points at a deficient absorption of* vitamin K.

The patient has no evidence of liver disease. The liver was not enlarged at physical examination bilirubin, bromosulphalein retention, serum electrophoresis and cholesterol were normal. The response to the treatment may be considered as additional evidence of liver integrity The patient had never complained of symptoms which could be attributed to a malabsorption syndrome. The haemorrhagic *manifestations were* the only clinical problem. The roentgenologic examination of the digestive tract failed to show any abnormality The patient was not anaemic. Oral glucose tolerance test, Shilling and I^{131} triolein tests were all normal. Why this patient is not absorbing vitamin K is not clear She has been followed for over a year and under oral treatment with hydrosoluble vitamin K she has been in very good health. We can only speculate that her abnormality involves the selective absorption of vitamin K.

Summary

A case of acquired deficiency of factor II, IX, X and probably of factor VII is reported. The hypoprothrombinaemia associated to factor IX deficiency seems secondary to selective deficient absorption of vitamin K without evidence of malabsorption.

Zusammenfassung

Es wird über einen Fall von erworbenem Mangel an Faktor II, IX, X und wahrscheinlich auch VII berichtet. Die Hypoprothrombinämie und der Mangel an Faktor IX scheinen durch eine *isolierte Störung der Resorption von Vitamin K ohne Zeichen* eines Malabsorptionssyndromes bedingt zu sein.

Résumé

Nous rapportons un cas d'un manque acquis des facteurs II, IX, X et probablement VII. L'hypoprothrombinémie et le manque de facteur IX semblent être causés par une perturbation isolée de la résorption de la vitamine K sans aucun signe d'un syndrome de malabsorption.

References

1 Hedde, L. A.; Anderson, B.G. and Friedlander, R. D. Acute idiopathic hypoprothrombinemia response to massive doses of vitamin K. Ann. intern. Med. 29, 347-363 (1948)

2. Lewis, S. H. and Biddett L. L. A study of factors A and B of prothrombin. J clin. Invest. 26. 1137 (1947)

3. Ley A. B.: Idiopathic hypoprothrombinemia associated with hemorrhagic diathesis and the effect of vitamin K. Blood 6. 740 (1951).

4. Spaet T. H. Clinical implications of acquired blood coagulation abnormalities. Blood 23. 839 (1964)

Authors' address: Dr. F. de Cataldo, Ospedale Maggiore, Piazza Ospedale Maggiore 3, *Milano-Niguarda* (Italy).

Acta haemat. 34 193–208 (1965).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg im Breisgau
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)

Untersuchungen über die Haemsynthese in roten Blutzellen

I. Mitteilung. Die Bildung von Fe⁵⁹-Hämoglobin in Haemolysaten und Suspensionen aus Kaninchenretikulozyten. Anwendung einer Pt [illegible] zur Isolierung des Haemoteins

Von H. Hempel, R. Clotten und L. Heilmeyer

Die Verbindung des Protoporphyrins und des Eisens zum Haem (Ferroprotoporphyrin) ist physiologischerweise ein enzymatischer Vorgang. Das spezifische Enzym, Haemsynthetase oder auch Ferrochelatase genannt, konnte bisher in kernhaltigen Vogelerythrozyten (5, 8, 3, 9), kernhaltigen roten Knochenmarkszellen (23, 20, 17, 15, 13, 16, 18), Leberzellen (13) und kernlosen Retikulozyten (25, 11, 10, 16, 18, 19, 4) nachgewiesen werden; dabei dient die Menge des unter optimalen Bedingungen *in vitro* neu gebildeten Haems als Maß der Enzymaktivität. Da die Haembildung der Blutzellen von einer Reihe weiterer Faktoren, z. B. dem Vorhandensein von Protoporphyrin bzw. Protoporphyrinogen in optimaler Konzentration, der Bereitstellung zweiwertigen Eisens in geeigneter Form und wahrscheinlich der gleichzeitigen Bildung des Globins (21, 11) abhängt, ist eine quantitative Aussage über die Haemsynthetaseaktivität nur vergleichend bei identischen Versuchsbedingungen möglich. Unsere Versuche mit Kaninchenretikulozyten, die in Hinsicht auf spätere Untersuchungen der Haembildung bei menschlichen Haemsynthesestörungen (7) durchgeführt wurden, beziehen sich nicht nur auf den letzten enzymatischen Schritt der Blutfarbstoffbildung, sondern auch auf die dieser Reaktion vorgeschalteten Stoffwechselvorgänge, die für die Bereitstellung des Substrats in reaktionsfähiger Form verantwortlich sind.

Die bei *in vitro*-Versuchen mit Blutzellen gebildete Menge von Blutfarbstoff ist im Vergleich zu der bereits im Ansatz enthaltenen

Mit Unterstützung der deutschen Forschungsgemeinschaft.

so gering, daß der Zuwachs nicht durch die direkte Bestimmung des Reaktionsproduktes erfaßt werden kann. Zur Erfassung des neugebildeten Haems müssen vielmehr isotopenmarkierte Substrate verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wird über den Einbau radioaktiven Eisens in das Haem *in vitro* berichtet. Diese Technik wurde von der Mehrzahl der obengenannten Autoren bei ähnlichen Untersuchungen verwendet. Da nur ein Teil des zugegebenen Radioeisens utilisiert wird, müssen zur Erfassung der Haemsynthese Haemeisen und Nicht Haemeisen nach der Inkubation getrennt werden. Die oben zitierten Autoren verwendeten dazu fast ausschließlich die Kristallisation des Haemins, die uns in der von Fischer angegebenen Methode mit Rekristallisation nach Shemin *et al* (22) ebenfalls einwandfreie Ergebnisse lieferte. Ein Nachteil ist der große Zeitaufwand der Methode, der die Durchführung grösserer Versuchsreihen erschwert. Nachdem Versuche mit Extraktionsmethoden unbefriedigend waren konnten wir eine rasche Isolierung des Haemeisen mit Hilfe einer Präzipitationsmethode erreichen, wobei nach den Angaben von Myhre (18) das an Proteine außer dem Haemoglobin gebundene Eisen durch Vorbehandlung mit Säure und Reduktionsmittel freigesetzt wurde. Da die von Myhre angegebene und von uns etwas modifizierte Technik unseres Erachtens einen wesentlichen Fortschritt für die Untersuchung der Haemsynthese darstellt, wird in der vorliegenden Arbeit auch kurz über die methodischen Vorversuche zur Anwendung der Präzipitationsmethode berichtet.

Methoden

Die Untersuchungen wurden an Erythrocyten von Kaninchen durchgeführt, bei denen durch Blutentzug eine Retikulocytose erzeugt worden war Phenylhydrazin wurde wegen der dadurch bewirkten Stoffwechselstörung der roten Blutzellen nicht verwendet. Für die Inkubationsversuche wurden den Tieren jeweils 30–60 ml Blut mittels einer heparinisierten Spritze entnommen und die Erythrocyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Alle Arbeiten von der Entnahme bis zu Beginn der Inkubation wurden im Eiswasserbad bzw in der Kühlzentrifuge bei 4 °C durchgeführt. Haemolysate aus den gewaschenen Zellen wurden mit Aqua bidest. und 0,15 mol Phosphatpuffer pH 7 4 im Verhältnis 1 1 1 hergestellt; zur Herstellung der Suspension wurde anstelle von Aqua bidest. 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet. In einzelnen Versuchen wurde auch mit 0,2 mol Trispuffer bzw Krebs-Ringer Trispuffer gearbeitet. Zur Inkubation wurde meist 3 ml Hämolysat bzw Suspension (= 1 ml Erythrocyten) im silikonisierten 25 ml Erlenmeyerkolben mit 0,1–0,3 μC Fe^{59} (Fe^{59}-Citrat, spez. Aktivität etwa 10 μC/μg) und den entsprechenden Zusätzen gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 5 ml gebracht. Bei Inkubation von ganzen Zellen wurden zur Verhinderung einer stärkeren mechanischen Hämolyse 0,5 ml einer 10%igen Polyvinylpyrrolidonlösung zugesetzt. Die Temperatur des Wasserbads betrug 37 °C, die Rotationsgeschwindigkeit

lag etwa bei 30 min. Die Reaktion wurde nach 4 Std. durch Zugabe von KCN (10 mg/ml) oder raschen Abkühlen gestoppt.

Zur Abtrennung des Haemeisens mit Hilfe der Präzipitationsmethode wurde je 1 ml des inkubierten Haemolysats mit 3 ml 0,2 mol Acetatpuffer auf pH 4,5–4,6 gebracht, mit etwa 1 mg Natriumdithionit versetzt und mindestens 20 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das pH durch Zugabe von 1 ml 2 nHCl auf unter 1 gesenkt, um [illegible] Eisen freizusetzen. Anschließend wurde mit 20%iger Trichloressigsäure gefällt und das Präzipitat zweimal mit etwa 10%iger Trichloressigsäure sowie zweimal mit H_2O gewaschen. Die Radioaktivität des Präzipitats wurde im Zentrifugenröhrchen im Bohrlochkristall gemessen und mit einer gleichen Menge des nicht präzipitierten Hämolysats bzw. mit einer an derselben Probe vor Präzipitation vorgenommenen Messung verglichen.

In einigen Vergleichsversuchen wurde das Haem als Ferroprotoporphyrinchlorid nach der Methode von Fischer kristallisiert, gewaschen und einmal aus Pyridin rekristallisiert. Dabei wurde vor der Verarbeitung 30 ml Trägerhaemolysat zugesetzt, so daß die Ausgangsmenge bei 2–3 g Hämoglobin lag. Die Ausbeute an rekristallisiertem Haem betrug 50–70% der theoretisch erwarteten, die auf der Basis des Molekulargewichtes des Haemoglobins von 66.000 errechnet wurde. Das Rekristallisat wurde nach Wägung wieder in 2 ml Pyridin aufgenommen, ebenfalls im Bohrlochkristall gemessen und mit einem Standard des Ausgangshämolysats verglichen.

Die Messungen erfolgten im Bohrlochscintillationszähler. Der Leerwert lag bei unserer Einstellung bei 100–150 I. p. m., die Ausbeute bei etwa 30%. Außer bei Kontrollversuchen mit sehr geringer Aktivität wurden mindestens 5000 Impulse ausgezählt, so daß der statistische Zählfehler unter 3%, meist unter 1% lag. Die Menge des im Haem wiedergefundenen Radioeisens als relatives Maß der Haembildung wurde in % der zugesetzten Radioaktivität angegeben.

Fe^{59}-Citrat wurde als isotonische Lösung der Firma Abbott bezogen und mit der entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Glycin und δ-Aminolaevulinsäure (δ-ALA) wurde in Form des Hydrochlorids in Aqua dest. oder HCl gelöst. Protoporphyrinhydrochlorid wurde aus käuflichem Protoporphyrin nach Reinigung über den Methylester und dessen Salzsäurehydrolyse kristallisiert.

Hämoglobinbestimmungen erfolgten nach der Cyanhämoglobinmethode, der Berechnung wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient: $\beta_{546} = 11{,}0$ zugrundegelegt. Der Hämatokrit wurde nach der Kapillarhämatokritmethode bestimmt. Die Retikulozytenzählung erfolgte nach Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau. Eisenbestimmungen wurden mit Hilfe der Bathophenanthrolinmethode durchgeführt.

Ergebnisse

I *Methodische Vorversuche zur Präzipitationsmethode*

a) Leerversuche Menschliche Erythrozyten aus einer längere Zeit gelagerten Blutkonserve wurden gewaschen und mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 hämolysiert. 10 ml Hämolysat wurden mit 1 μC Fe^{59}-Citrat in 10 ml Kochsalzlösung gemischt und 16 Proben dieser Mischung in der oben beschriebenen Weise präzipitiert und gewaschen. Die Radioaktivität des Präzipitats lag immer unter 0,2% des zugesetzten Fe^{59}. Im letzten Waschwasser fand sich keine meßbare Radioaktivität mehr. Wenn das gleiche Hämolysat mit

Phosphatpuffer Radioeisen und Protoporphyrin in optimaler Konzentration 4 Std. bei 37 inkubiert wurde, lag die Radioaktivität im Präzipitat mit 0,2–0,5 % der zugesetzten Menge etwas höher

b) Versuche mit Fe^{59} Hämoglobin. Ein Kaninchen erhielt 20 µC Fe^{59}-Citrat i. v. injiziert. 8 Tage später wurde eine größere Blutprobe entnommen, die Erythrozyten gewaschen, mit Aqua dest. hämolysiert und 30 min bei 15000 Umdrehungen zentrifugiert. Im Präzipitat der überstehenden klaren Hämoglobinlösung war bei 10 Bestimmungen 97,6 ± 1,2 % des Fe^{59} enthalten. Der Verlust an hämoglobingebundenem Eisen bei der Präzipitation beträgt also höchstens 5 %. Da ein geringer Teil des Fe^{59} sich als Nicht-Haemeisen in den Zellen befinden dürfte, ist der echte Verlust wahrscheinlich noch niedriger

c) Versuche mit gleichzeitiger Kristallisation und Präzipitation. Bei einer Reihe der später beschriebenen Inkubationsversuche wurde die prozentuale Fe^{59}-Radioaktivität sowohl im kristallisierten Hämin wie im Präzipitat geprüft. Wie Abb. 1 zeigt, ergibt sich eine befriedigende Korrelation beider Methoden, wobei die Abweichung der mit beiden Methoden erhaltenen Einzelwerte maximal 10 % betrug

Bei insgesamt 81 Doppelbestimmungen mit der Präzipitationsmethode aus demselben Ansatz lag die durchschnittliche Abweichung bei 2,1 % des Mittelwertes. Dabei wurden allerdings nur An-

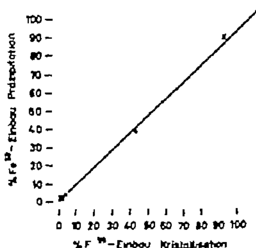


Abb. 1 Bestimmung des Fe^{59} Haem bei verschiedenen Inkubationsversuchen mit zwei Isolierungsmethoden. Der Wert x wurde durch in vivo-Markierung gewonnen. Der Eiseneinbau ist in % der zugesetzten Gesamtradioaktivität angegeben.

sätze mit Einbauwerten von über 5 % berücksichtigt, bei denen eine ausreichend genaue Radioaktivitätsmessung im Präzipitat möglich war.

2. Zeitlicher Verlauf des Fe^{59} Einbaus in vitro

In zwei Ansätzen, die jeweils 10 ml Erythrozyten enthielten, wurde der zeitliche Verlauf der Haemsynthese verfolgt. Die Ansätze wurden bei 4° C hergestellt, die erste Meßprobe wurde direkt vor Einbringen in das Wasserbad, weitere Proben aus demselben Ansatz in den aus Abb. 2 ersichtlichen Zeitabschnitten entnommen. Die Reaktion in den entnommenen Proben wurde bei Versuch Nr. 133 durch sofortiges Mischen mit 1 ml einer 1 %igen KCN Lösung, bei Versuch 203 durch Einbringen von je 1 ml in tiefgekühlte Reagenzgläser gestoppt. Wie die Ergebnisse der bei jeder Entnahme vorgesehenen Doppelbestimmung des Hämoglobingebundenen Fe^{59} zeigten, wurde durch KCN die Reaktion zuver

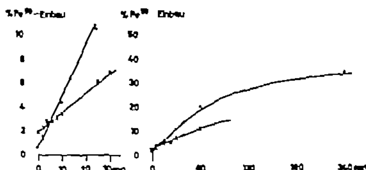


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Haemsynthese in vitro. Die Ansätze enthielten 5×10^{-8} mol Protoporphyrin und 1×10^{-4} mol Ascorbinsäure.

länger abgebremst als durch Abkühlung. Die letztere Methode wurde in Versuch 203 deswegen gewählt, weil eine Verhinderung der reduktiven Freisetzung des Eisens aus Ferritin durch das KCN vorstellbar wäre. Wie Abb. 2 zeigt, haben jedoch die Kurven der beiden Versuche prinzipiell den gleichen Verlauf. In den ersten 30 Minuten steigt der Anteil des hämoglobingebundenen Fe^{59} linear an, um nach 4 Std. etwa sein Maximum zu erreichen. Allerdings war ein gewisser weiterer Anstieg auch in den folgenden 16 Stunden in Versuch 203 zu erkennen.

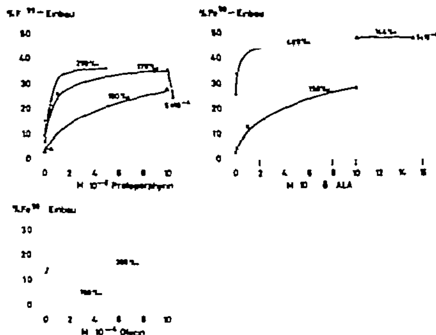


Abb. 3. Stimulation der Haemsynthese in Retikulozytenhämolysaten durch verschiedene Konzentrationen von Protoporphyrin, δ-ALA und Glycin.

3. Abhängigkeit des Radioeiseneinbaues in Hämolysaten von der Substratkonzentration

Der Fe^{59} Einbau liegt im Hämolysat aus Kaninchenerythrozyten nach vierstündiger Inkubation eindeutig über den beschriebenen Leerwerten, ist jedoch zumindest bei Retikulozytenzahlen unter 200‰ mit 1–5 / relativ gering. Zusatz von δ-ALA oder Protoporphyrin bewirkt eine mehrfache Erhöhung der Haemsynthese, dagegen hat Glycin in vergleichbarer Konzentration keine deutliche Wirkung (Abb. 3). Es fällt auf, daß bei höheren Retikulozytenzahlen mit entsprechend hohem Anteil unreifer Formen der Fe^{59} Einbau ohne Substrat beträchtlich höher liegt und schon geringe Konzentrationen der Substrate δ-ALA und Protoporphyrin eine optimale Stimulation der Haemsynthese bewirken. Nachdem wir die fehlende Utilisation des Glycins für die Haemsynthese im Retikulozytenhämolysat festgestellt hatten, wurden weitere Versuche mit Glycin in einer Konzentration von 1×10^{-4} mol unter Zusatz von Ascorbinsäure (5×10^{-4}), ATP (1×10^{-3} mol) und

Tabelle I

Vergleichende Untersuchung der Haemsynthese unter verschiedenen Bedingungen an denselben Retikulozyten. Glycinkonzentration 1×10^{-4} bis 1×10^{-6} mol. δ-ALA-Konzentration 1×10^{-4} bis 5×10^{-4} mol. Protoporphyrinkonzentration 5×10^{-6} bis 1×10^{-4} mol. Der Fe^{59}-Einbau ist in % der zugesetzten Gesamtradioaktivität angegeben.

Protokoll Nr	Retikulozyten %		Hämolysat			Suspension
		ohne Substrat	Glycin	δ-ALA	Proto	ohne Substrat
174/176	100	1,9	1,3	27,6	16,1	—
209	120	40,1	42,9	55,3	68,3	85,0
168	140	6,3	7,0	41,7	42,2	49,9
171	140	4,1	—	—	45,0	44,9
196	140	1,6	1,4	18,2	31,4	66,0
85	150	2,4	—	—	52,0	47,0
154/158	150	2,8	2,0	28,4	28,4	—
206	300	16,0	20,0	23,0	30,0	73,0

Pyridoxalphosphat (1×10^{-3}) durchgeführt, auch dabei zeigte sich keine Wirkung des Glycins trotz eindeutig positiver Kontrolle mit Protoporphyrin (16,1% Einbau).

4. *Vergleichende Versuche mit Zellsuspensionen und Hämolysaten*

Suspensionen aus intakten Kaninchenretikulozyten zeigen im Gegensatz zu Hämolysaten einen sehr hohen Fe^{59}-Einbau in das Hämoglobin auch ohne Zusatz von Substrat. In Tabelle I sind die Ergebnisse von mehreren Inkubationsversuchen aufgeführt, bei denen Suspensionen und Hämolysate mit verschiedenem Substratzusatz unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Die Haembildung ist in Suspensionen auch ohne Substratzusatz immer höher als in entsprechenden Hämolysaten. Nur in den Versuchen 168 und 171, in denen δ-ALA bzw. Protoporphyrin zugesetzt wurden, werden die bei den Zellsuspensionen zu beobachtenden Einbauraten annähernd erreicht. Zwischen den beiden Substraten besteht in bezug auf die Steigerung der Haemsynthese kein sicherer quantitativer Unterschied. Glycinzusatz in vergleichbarer Konzentration erbrachte ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen keine wesentliche Steigerung der Haemsynthese. Die Versuche Nr. 206 und 209 wurden mit den Erythrozyten eines Tieres vorgenommen, dem wir über 10 Tage mehrmals größere Blutmengen entnommen hatten. Ebenso wie bei Versuch Nr. 122 und 124 (Abb. 2), zu dem auch die Erythrozyten eines mehrmals stark entbluteten Tieres benutzt wurden, ist die Einbaurate im Hämoly-

Tabelle II

Fe^{59}-Einbau in das Hämoglobin von Retikulozytensuspensionen bei Zusatz verschiedener Substrate.

Protokoll Nr.	Retikulozyten /‰	ohne Substrat	Suspension Glycin	δ-ALA	Protoporph.
172	100	39,6	27,8	42,0	33,2
225	90	37,8	29,2	25,8	58,5

sat auffällig hoch und die zusätzliche Haemsynthese bei Substratzusatz wenig ausgeprägt.

Zusatz von Substraten zu den Suspensionen hatte nur eine geringe Steigerung des Fe^{59} Einbaus in das Hämoglobin zur Folge (Tabelle II). In Kontrollansätzen, die 10 mg KCN enthielten oder vor der Inkubation 10 bis 20 min. auf 65° erhitzt worden waren, lag der prozentuale Eiseneinbau immer unter 2 %.

5. *Wirkung reduzierender Substanzen*

Von GOLDBERG *et al.* (5) und LOCHHEAD *et al.* (13) wurde eine Steigerung der Haembildung aus Protoporphyrin und Fe^{59} bei Zusatz reduzierender Substanzen wie Ascorbinsäure, Gluthation-SH und Ergothionin an Vogelerythrozyten und Kaninchenknochenmarkszellen nachgewiesen. Wir konnten mit Ascorbinsäure und Cystein nur eine geringe Steigerung des Eiseneinbaus erreichen (Tabelle III).

Tabelle III

Wirkung von Ascorbinsäure und Cystein auf die Haembildung im Retikulozytenhaemolysat. Protoporphyrinkonzentration 5×10^{-6} M. Der Fe^{59}-Einbau ist in % der zugesetzten Gesamtradioaktivität angegeben.

	—	1×10^{-4} M	1×10^{-4} M	1×10^{-4} M
Ascorbinsäure	32,3	40,4	42,5	32,0
Cystein	32,3	32,5	30,3	48,6

6. *Wirkung verschiedener Eisenkonzentrationen auf den Radioeisenanbau*

Der durch Verunreinigungen bedingte Eisengehalt in unseren Ansätzen (ohne Hämolysat bzw. Zellen) lag unter der unteren Bestimmungsgrenze von 10 μg/100 ml, die Ansätze enthielten also weniger als 0,5 μg exogenen Eisens. Die mit Fe^{59} zugesetzte Eisenmenge ist bei der hohen spezifischen Aktivität (die verwandte Menge von 0,1 bis 0,3 μC entsprechen etwa 1×10^{-3} μg Eisen) zu

vernachlässigen. Zusatz von Trägereisen hat ein Absinken des relativen Fe^{59} Einbaus zur Folge, der jedoch hinter der Erhöhung der Eisenkonzentration im Ansatz zurückbleibt (Abb. 4). Man muß daraus schließen, daß entweder die Haemsynthese von der angebotenen Eisenkonzentration im untersuchten Bereich abhängig ist, oder daß eine größere Menge intrazellulären Nicht-Haemeisens für die Haemsynthese zur Verfügung steht.

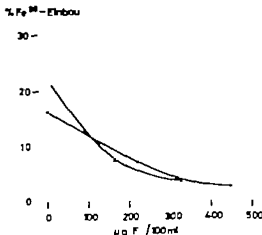


Abb. 4. Fe^{59}-Einbau in das Haem im gleichen Hämolysat unter Zusatz verschiedener Eisenmengen. Die Ansätze enthielten 5×10^{-4} mol Protoporphyrin.

Diskussion

Verwendet man radioaktives Eisen zur Bestimmung der Haemsynthese *in vitro*, so ist es notwendig, nach der Inkubation das Haemeisen von dem übrigen im Ansatz verbliebenen Radioeisen zu isolieren. Da die mehrmalige Kristallisation des Haems nach der Methode von FISCHER relativ umständlich und zeitraubend ist, führten wir Versuche mit der von MYHRE (18) angegebenen Präzipitationsmethode durch, die einen wesentlich geringeren Zeitaufwand als die Kristallisationsmethoden erfordert. Man muß sich darüber im klaren sein, daß dabei nicht die Haem-, sondern die Hämoglobin-Eisen-Fraktion abgetrennt wird; nach den Untersuchungen von KRUH UND BORSOOK (11) sowie SCHWARTZ *et al.* (21) geht die Haembildung jedoch gleichzeitig mit der Bindung des Protophyrins an das Globin vor sich; unter Umständen wird das

Eisen sogar in den Globin-Protoporphyrinkomplex eingebaut, so daß die molare Haembildung mit der Hämoglobinbildung unter diesen Bedingungen gleichzusetzen ist. Bei der einfachen Trichloressigsäurepräzipitation wie sie z. B. von MALAMOS *et al.* (14) bei Inkubationsversuchen mit Thalassämieblut verwendet worden ist, wird nicht nur das Hämoglobineisen, sondern das gesamte eiweißgebundene Eisen erfaßt; es ist also notwendig vor der Eiweißfällung das Nicht-Haemeisen aus der Proteinbindung freizusetzen. Es handelt sich dabei vor allem um Ferritin, Hämosiderin, Transferrin und wahrscheinlich auch um nicht näher zu definierende Stromaeiweiße. Aus Ferritin und Hämosiderin wird das Eisen durch reduzierende Substanzen bei pH 4,4–4,8 freigesetzt (6), die Transferrinbindung wird durch HCl in genügend hoher Konzentration gespalten (12). Auch die z. B. von ALLEN UND JANDL (1) nachgewiesene Bindung an Stromaeiweiße wird anscheinend bei der beschriebenen Vorbehandlung mit Acetatpuffer, Natriumdithionit und Salzsäure gelöst. Wir fanden bei vergleichender Präzipitation aus dem Gesamthämolysat und dem daraus gewonnenen stromafreien Überstand ebenso wie MYHRE (18) denselben Anteil des Radioeisens im Präzipitat. Der Anteil des nach Waschung im Präzipitat verbleibenden freien Eisens ist mit 0,1–0,5 % der zugesetzten Menge gegenüber den in unseren Untersuchungen beobachteten Einbauwerten so gering, daß er vernachlässigt werden kann. Ebenso wie MYHRE fanden wir bei Verarbeitung einer Fe^{III}-Hämoglobinlösung 97 % der Gesamtaktivität im Präzipitat wieder, so daß der Verlust bis der Isolierung sicher unter 3 % liegt. Bei der Bestimmung des Haem- bzw. Hämoglobinradioeisenanteils verschiedener Ansätze nach Kristallisation oder nach Präzipitation lag eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden vor (Abb. 1). Die beobachteten Abweichungen gehen kaum über die Differenzen bei Doppelbestimmungen mit der Kristallisationsmethode hinaus und sind am ehesten der Fehlerbreite dieser Technik zur Last zu legen. Diese Übereinstimmung spricht unter anderem für die Richtigkeit der oben erwähnten Annahme, daß die molare Haem- und Hämoglobinbildung *in vitro* gleich ist, falls nicht gereinigte Haemsynthetasepräparate, sondern Zellen bzw. Vollhämolysate aus Erythrozyten verwendet werden. MYHRE fand eine befriedigende Übereinstimmung bei vergleichender Anwendung der Präzipitation und der elektrophoretischen Isolierung des Hämoglobins. Bei der von uns verwendeten Technik kann die Messung der Ge-

samtradioaktivität im Hämolysat, die Präzipitation und Waschung sowie die anschließende Messung des im Hämoglobin enthaltenen Radioeisens im selben Probenröhrchen vorgenommen werden, so daß Pipettierfehler beim Abmessen der zu verarbeitenden Menge entfallen. Die Abweichung bei Doppelbestimmungen des hämoglobingebundenen Eisenanteils im selben Hämolysat war mit durchschnittlich 2,1% gering, wenn die Radioaktivitätsmessung selber mit einem entsprechend geringen statistischen Fehler möglich war. Nach unseren Erfahrungen ist also die von Myhre angegebene, einfache und zeitsparende Präzipitationsmethode zur Bestimmung des im Hämoglobin enthaltenen Radioeisenanteils genau so gut geeignet wie die früher verwendeten, zeitlich wesentlich aufwendigeren präparativen Methoden.

Seit den ersten Radioeisenuntersuchungen von Walsh *et al.* (23) ist bekannt, daß Retikulozyten die Fähigkeit der Erythroblasten zur Hämoglobinbildung zu einem geringen Teil bewahrt haben und daß diese Hämoglobinsynthese auch *in vitro* nachweisbar ist. Goldberg *et al.* (5) konnten an Vogelerythrozyten zeigen, daß es sich bei dem letzten Schritt der Haemsynthese, der Verbindung von Protoporphyrin und Eisen, um einen enzymatischen Vorgang handelt. Die enzymatische Natur der Haembildung wird unter anderem dadurch gewiesen, daß sich der Eiseneinbau durch Zusatz von Kaliumcyanid oder Erhitzen des Ansatzes fast vollständig hemmen läßt, was auch bei unseren Kontrollversuchen der Fall war. Ebenso wie in ähnlichen an Vogelerythrozyten durchgeführten Experimenten (5, 21) fanden wir einen linearen zeitlichen Verlauf der Haembildung in den ersten 30 Minuten der Inkubation; nach 4 Stunden war nur noch eine gering zusätzliche Reaktion zu beobachten. Reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure und Cystein (3) führten auch an Retikulozyten zu einer geringen Steigerung des Eiseneinbaus.

Die direkte Berechnung der tatsächlich neu gebildeten Haem- bzw. Hämoglobinmoleküle ist mit der Radioeisenmethode nicht möglich, da die Zellen selber einen gewissen Vorrat verwendungsfähigen Eisens enthalten, der meßtechnisch nicht zu erfassen ist. Die effektive spezifische Radioaktivität des für die Haemsynthese utilisierten Radioeisens ist also nicht bekannt. Auf die Existenz eines solchen Eisenvorrats weisen unsere Versuche mit verschiedenen Trägereisenkonzentrationen hin, bei der die Abnahme der relativen Inkorporationsrate der zugesetzten Gesamteisenmenge

nicht proportional war. Ähnliche Befunde haben LOCHHEAD *et al.* (13) an Erythroblasten erhoben. BANNERMAN *et al.* (2), VAVRA *et al.* (24) sowie NAJEAN *et al.* (19) konnten die Bedeutung des intrazellulären Pools von utilisierbarem Eisen in vergleichenden Versuchen mit C^{14}-markierten Porphyrinvorstufen und Fe^{59} beweisen. Für vergleichende Untersuchungen an denselben Zellen, wie sie hier durchgeführt wurden, spielt aber der Verdünnungsfaktor durch das zelleigene Vorratseisen keine Rolle.

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Fe^{59}-Hämoglobinbildung der Retikulozyten wurden meist an Suspensionen intakter Zellen durchgeführt, im Gegensatz zu den Versuchen von GOLDBERG *et al.*, die mit hämolysierten Vogelerythrozyten gearbeitet haben. Bei Untersuchungen an Suspensionen und Hämolysaten der gleichen Kaninchenretikulozyten konnten wir feststellen, daß unter sonst identischen Versuchsbedingungen die Haembildung in der Suspension um ein Vielfaches höher lag als im Hämolysat. Durch Zusatz von δ-ALA und Protoporphyrin ließ sich die Haembildung im Hämolysat wesentlich steigern, wenn sie auch die in der Suspension gemessenen Werte nicht ganz erreichte. Die optimalen Substraktkonzentrationen lagen mit etwa 5×10^{-3} mol (s. Abb. 2) ebenso wie bei den Versuchen von GOLDBERG *et al.* (5) sowie VAVRA *et al.* (24) um ein Vielfaches über der physiologischen Substratkonzentration, die in retikulozytenreichem Kaninchenblut etwa 3×10^{-6} mol/100 ml Erythrozyten (δ-ALA) bzw. 5×10^{-7} mol/100 ml Erythrozyten (Protoporphyrin) beträgt. Dagegen konnte durch Glycin in Konzentrationen bis zu 1×10^{-3} mol die Hämoglobinbildung im Hämolysat nicht restauriert werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem von GOLDBERG, entspricht aber gleichartigen Beobachtungen von SCHWARTZ *et al.* (21) an Vogelerythrozytenhaemolysaten sowie von MAZUR UND CARLTON (16) an Hämolysaten von Kaninchenretikulozyten. Die letztgenannten Autoren konnten ebenfalls eine erhebliche Beeinträchtigung des Eiseneinbaues durch Lyse der Zellen feststellen. Bei menschlichen Retikulozyten sind nach den Angaben von VAVRA die Unterschiede zwischen Suspension und Hämolysat wesentlich geringer als bei unseren Kaninchenversuchen.

Wie läßt sich die Abnahme des Radioeiseneinbaus durch die Hämolyse erklären? Verschiedene Möglichkeiten müssen diskutiert werden. Eine Vermehrung des zelleigenen utilisierbaren Eisens oder

eine Bindung des zugesetzten Radioeisens in der Weise, daß es nicht mehr voll für die Haemsynthese zur Verfügung steht, ist als Ursache der Hemmung unwahrscheinlich, da Protoporphyrinzusatz die Haembildung weitgehend wieder herstellt, während reduzierende Substanzen allein oder mit Glycin keine Wirkung haben. Wenn ein vermindertes Angebot von Protoporphyrin allein für die Senkung der Haembildung im Hämolysat verantwortlich ist, muß der Aufbau der δ-ALA aus Glycin und Bernsteinsäure gestört sein, da δ-ALA die Haembildung im Hämolysat fast ebenso stark stimuliert wie Protoporphyrin. Die Untersuchungen von HEILMEYER UND CLOTTEN (7) haben gezeigt, daß die Porphyrinsynthese mit δ-ALA im Hämolysat ungestört abläuft und nicht als begrenzende Reaktion der Haem- bzw Protoporphyrinsynthese anzusehen ist. Es ist kaum vorstellbar daß in den intakten Zellen auch nur annähernd soviel δ-ALA nachgebildet wurde, wie wir zur optimalen Stimulation im Hämolysat zusetzen müssen eigene Inkubationsversuche mit Zusatz von Glycin und Bestimmung der δ-ALA und des Porphobilinogen haben auch keine großen Unterschiede zwischen Hämolysaten und Suspensionen gezeigt. Eine Storung der δ-ALA-Synthese kann also die beobachteten Unterschiede allein nicht befriedigend erklären. Man muß daher annehmen, daß tatsächlich der letzte enzymatische Schritt der Haembildung, d. h. der Einbau des Eisens in das Protoporphyrin durch die Zerstörung der Zellstruktur beeinträchtigt wird. Durch Steigerung der Substratkonzentration auf unphysiologisch hohe Werte kann der Prozeß der Haembildung im Hämolysat wieder beschleunigt werden die in den ganzen Zellen gemessenen Werte wurden bei uns aber auch bei optimaler Substratkonzentration nicht mehr erreicht. Ob die δ-ALA Bildung aus Glycin zusätzlich durch Hämolyse beeinträchtigt wird kann aus unseren Versuchen nicht entschieden werden sie reicht jedenfalls auch bei hoher Glycinkonzentration nicht aus, um die unphysiologisch hohe Porphyrinkonzentration zu erreichen, die zur vollen Ausnutzung der noch vorhandenen Restaktivität im Hämolysat notwendig ist. Die Hemmung des Eiseneinbaues in das Protoporphyrin hängt am ehesten damit zusammen, daß die Haemsynthetase, im Gegensatz zu den löslichen Enzymen der Porphyrinsynthese, in der unlöslichen Zellfraktion, wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisiert ist (5 21) und die notwendigen intrazellularen Transportvorgänge nach Hämolyse nicht mehr optimal ablaufen können.

Wie aus Abb 3 und Tabelle I hervorgeht, fand sich bei einzelnen Versuchen ein überraschend hoher Eiseneinbau auch im Hämolysat ohne Substratzusatz. Es handelt sich ausnahmslos um Blutproben von Versuchstieren, bei denen mehrmals in kurzen Zeitabständen größere Blutmengen entnommen worden waren und die meist eine besonders starke Retikulozytose mit vorherrschend junger Retikulozytenformen aufwiesen. Über spezielle Untersuchungen an solchen besonders aktiven Retikulozytenproben wird in einer späteren Veröffentlichung berichtet werden.

Zusammenfassung

Die Hämoglobinbildung in Kaninchenretikulozyten in vitro wurde mit Hilfe des Radioeiseneinbaus untersucht. Mit der von Mynaux angegebenen Präzipitationsmethode läßt sich die Auftrennung von Haemeisen und Nicht-Haemeisen im Ansatz relativ rasch und einfach durchführen. Vergleichsuntersuchungen mit der Haemkristallisation nach Fischer ergaben eine gute Übereinstimmung der Resultate. Die Fe^{59}-Hämoglobinbildung wird durch Lyse der Zellen erheblich vermindert und durch Zusatz der Substrate δ-ALA oder Protoporphyrin nur teilweise wieder hergestellt. Durch die Zerstörung der Zellstruktur wird vorzugsweise der letzte Schritt der Haemsynthese, nämlich der Einbau des Eisens in das Protoporphyrin bzw. den Protoporphyrin-Globinkomplex beeinträchtigt. Bei Haembildungsversuchen in Retikulozytenhämolysaten wird eine Restaktivität der Haembildung bei unphysiologisch hoher Substratkonzentration gefunden.

Summary

Haemoglobin formation in rabbit erythrocytes was studied *in vitro* by measuring the incorporation of radioactive iron. Haem and non-haem iron can be distinguished relatively rapidly and simply by Mynaux's precipitation method. Comparison with the results of Fischer's? haem crystallization method showed good agreement. Formation of Fe^{59} labelled-haemoglobin is considerably reduced by cell lysis and only partially restored by the addition of the substrates δ-ALA or protoporphyrin. Cellular destruction impairs particularly the last stage of haem synthesis, viz. the incorporation of iron into protoporphyrin or the protoporphyrin-globin complex. Residual haem activity is investigated experimentally in reticulocyte haemolysates with an unphysiologically high concentration of substrate.

Résumé

La formation de l'hémoglobine dans les réticulocytes du lapin a été étudiée à l'aide de l'incorporation de fer radio-actif *in vitro*. La méthode de précipitation indiquée par Mynaux permet une séparation relativement rapide et simple du fer contenu et non contenu dans l'hème. La méthode de cristallisation de l'hème d'après Fischer donne des résultats correspondant bien. La formation d'hémoglobine radio-marquée au Fe^{59} est fortement diminuée par la lyse des cellules et n'est que partiellement rétablie par l'adjonction de delta-ALA ou de protoporphyrine. C'est avant tout le dernier pas de la synthèse de l'hème, celui de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine respectivement dans le complexe protoporphyrine-globine, qui est freiné par la destruction des structures cellulaires. Lors d'essais de synthèse dans des hémolysats de réticulocytes, nous avons trouvé un reste de formation d'hème en présence de concentrations anormalement fortes de substrat.

Literatur

1. Allen, D. W. and Jandl, J. H. Kinetics of intracellular iron in rabbit reticulocytes. Blood *15*, 71 (1960)
2. Bannerman, R. M.; Grinstein, M. and Moore, C. V.: Haemoglobin synthesis in thalassaemia; *in vitro* studies. Brit. J. Haemat. *5*, 102 (1959)
3. Bianco, L. and Lazzarini, E. Incorporation rates of 2-C^{14}-glycine into globin and haem by duck red cells incubated *in vitro* with plasma or saline. Nature *195*, 441 (1962).
4. Gajdos-Török, M.; Gajdos, A. et Bernard, H. Etude par le fer radioactive de l'enzyme catalisant la biosynthèse de l'hème. Sang *30*, 459 (1959).
5. Goldberg, A. H.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G. E. and Wintrobe, M. M. Studies on the biosynthesis of heme *in vitro* by avian erythrocytes. Blood *11*, 821 (1956)
6. Granick, S.: Structure and physiological functions of ferritin. Physiol. Rev. *31*, 489 (1951)
7. Heilmeyer, L. Die Störungen der Bluthämsynthese (Thieme, Stuttgart 1964)
8. Kassenaar, A.; Morell, H. and London, I. M. The incorporation of glycine into globine and the synthesis of heme *in vitro* in duck erythrocytes. J. biol. Chem. *229*, 423 (1957).
9. Klein, J. R. Protoporphyrin and heme formation by erythrocytes from the x-irradiated and bled duck. Amer. J. Physiol. *201*, 663 (1961)
10. Kruh, J. Biosynthèse de l'hémoglobine par les systèmes acellulaires des réticulocytes. Path. Biol. *10*, 17 (1962).
11. Kruh, J. and Borsook, H. Hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes *in vitro*. J. biol. Chem. *220*, 905 (1956)
12. Laurell, C. B. Studies on the transportation and metabolism of iron in the body. Acta physiol. scand. *14*, suppl. 46 (1947).
13. Lochhead, A. C.; Kramer, S. and Goldberg, A. Quantitative measurement of the iron incorporating enzyme in relation to marrow cells and liver tissue in the rabbit. Brit. J. Haemat. *9*, 39 (1963)
14. Malamos, B.; Gyftaki, E. and Prokakis, Ch. Uptake of Fe^{59} by acid insoluble elements of normal and thalassemic hemolysates. *In vitro* studies. Acta haemat. *31*, 79 (1964)
15. Mazanowska, A.; Dancewicz, A. M. und Kowalski, E. Hemmung der Inkorporation von Eisen in Protoporphyrin durch Plasma. Folia haemat. (Lpz.) *78*, 414 (1962).
16. Mazur, A. and Carleton, A. Relation of ferritin iron to heme synthesis in marrow and reticulocytes. J. biol. Chem. *238*, 1817 (1963)
17. Morell, H.; Savoie, J. C. and London, I. M. The biosynthesis of heme and the incorporation of glycine into habbit bone marrow *in vitro*. J. biol. Chem. *233*, 923 (1958).
18. Myhre, E. Iron uptake and hemoglobin synthesis by human erythroid cells *in vitro*. Scand. J. clin. Lab. Invest. *16*, 212 (1964).
19. Najean, Y.; Ardaillou, N. et Mulmann, M. Etude des compartiments non héminiques du fer. Nouv. Rev. franç. Hémat. *4*, 31 (1964)
20. Powsner, E. R. and Berman, L. Correlation of radioactive hemin formation with morphologic alterations in cultures of human bone marrow. Blood *12*, 777 (1957)

21. SCHWARTZ, H. C., CARTWRIGHT, G. E., SMITH, E. L. AND WINTROBE, M. M.: Studies on the biosynthesis of heme from iron and protoporphyrin. Blood [illegible], [illegible] (1959).

22. SHEMIN, D., LONDON, I. M. AND RITTENBERG, D.: The synthesis of protoporphyrin in vitro by the red blood cells of the duck. J. biol. Chem. [illegible], 757 (1950).

23. THOMAS, E. D.: In vitro studies of erythropoiesis. I. The effect of normal serum on heme synthesis and oxygen consumption by bone marrow. Blood [illegible], 600 (1955).

24. VAVRA, J. D., KIRCHHOFF, V., MAYER AND MOORE, C. V.: In vitro heme synthesis by human blood. Abnormal heme synthesis in thalassemia major. J. Lab. clin. Med. 63, 736 (1964).

25. WALSH, R. J., THOMAS, E. D., CHOW, S. K., FLECHARTY, R. G. AND FINCH, C. A.: Iron metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes. Science [illegible], 396 (1949).

Adresse der Autoren: Dr. H. Heimpel, Dr. R. Clotten und Dr. L. Hellmeyer, Med. Univ.-Klinik, [illegible] Strasse 55, 78 Freiburg im Br. (Deutschland).

Acta haemat. 34: 209–214 (1965)

Fundacion Hematologica de Mar Del Plata

Substitutive Inhibitory Gamma Globulin Therapy as Prevention of Stillbirth in Rh Incompatibility

By E. Rewald and F. Suringar

The exact regulation of γ-globulin metabolism is not known. According to the idea of replacing pathological factors by normal (i.e. substitutive inhibitory treatment in constitutional non-spherocytic disease) (1) massive doses of human γ-globulin were injected to a pregnant woman sensitized against Rh of fetal red cells. Up to a certain extent, mother and fetus form a unit and the development of this incompatibility may be considered pathological. Our target is to inhibit at least partially the antibody production in order to avoid stillbirth.

Case Report

M.V. pregnant woman aged 27 years was admitted near the eight month when anti-D antibodies were detected.

Past history: At the age of 20 years she gave still-birth by cesarean. On this occasion she received blood unit of compatible blood from her brother (d/d). At the age of 23 her son Luis was born. In the cord blood the direct antiglobulin test was strongly positive and exchange transfusion was performed at 36 hours of life, when bilirubin level reached 28.8 mg%. After this, splenomegaly and jaundice disappeared progressively remaining the child without sequels.

On *admission* (February 12) the pregnant patient seemed to be healthy. The antibody titre of serum incubated with the iso-group erythrocytes of the husband determined by Coombs technique were 1/8. One month ago the indirect Coombs test was negative. The γ-globulin treatment was started by via intramuscular during the first two days and continued intravenously at increasing doses up to 13 g daily until reaching 72 g (February 26). Afterwards she received reinforcement doses of 6.4 g on alternative days reaching total amount of 103.32 g. The pooled human γ-globulin was diluted 1% in saline and injected by intravenous slow dropping. In our patient no side effects were observed. During this period the antibody concentration remained nearly constant, but one month after delivery the titre rose suddenly from 1/8 up to 1/32. The anti-B titre was 1/64 and diminished after delivery slightly to 1/32. The whole family has blood group A.

The delivery of the boy weighing 3.1 kg was spontaneous and normal. In the cord blood the direct antiglobulin test was clearly positive, inheriting the child the D-factor from his father. Nevertheless we could not observe any clinical symptom related with erythroblastosis. The bilirubin level increased only up to 1.3 mg% and during the first month of life no anaemia developed, neither increasing of reticulocytes. Spleen was not palpable and the size of the liver remained normal.

If first affected infants are excluded, the rate of intrauterine death amongst Rh-positive fetuses carried by mothers whose serum contains anti Rh is about 29% (2). Although the disease tends to be more severe in subsequent siblings, occasionally mild disease may follow stillbirths due to Rh incompatibility, a fact which should make one cautious in interpreting apparent successes in the treatment of pregnant women with a 'bad history'. Our single clinical observation induces us to look for an experimental basis.

Methods

Female albino rats fed with Forramex[1] and water ad libitum were housed in individual cages at 21–23 °C. Half of each litter was placed one day after birth in the experimental group and the remaining rats served as controls. In order to guarantee normal growth the maximum number per litter was 8. Volume and frequency of intraperitoneal injections were identical in all cases. Serum was collected from adult rats, mostly male, as pure homologous γ-globulin was not available.

Homologous serum. daily injections in order to obtain high γ-globulinemia during the first week. Further injections were equal to 1.6% of body weight plus 78% of the daily weight increase.

Controls. Equivalent volume of saline injections.

At the age of three weeks both groups were sensitized with sheep erythrocytes (washed and resuspended) via intraperitoneal. These were given on alternative days, *always at least three hours after the daily injection.* Three initial doses of 0.3 ml and two of 0.1 ml. Two days after the fifth sensitizing injection the induced antibody titre was determined (table I). Since then, injections were interrupted and in some cages the antibody titre was repeated seven days later.

Other litters received the injections one day before starting the sensitization with sheep-erythrocytes. In order to boost the γ-globulin content in the experimental group, an additional amount equal to 10% of body weight was injected during the first three days. These animals were compared to other litters where similar injections were applied during the last five days of the experiment, that is to say five days after sensitization against sheep-erythrocytes was started.

Agglutination was read after incubation during three hours at room temperature and further maintenance at 4 C until the next morning. Body weight, protein and γ-globulin level in serum, as well as hematocrit were determined. Histological examination and weight of timus and spleen were performed, as well as histological protocol of liver and kidney.

[1] *Chem. analysis.* protein 17 %, fat 4.6%, carbon hydrate 56%, minerals 6%, calcium 1%, phosphorus 1%, vit. A, D_2, B_1, B_2, B_6, B_{12}, choline nitrate, Ca-pantothenate, vit. K_3, E, etc. raw fibre max. 3.8%.

ml% of body weight, day 1 4%, 2: 4.23%, 3 4.46%, 4 4.69%, 5 4.92%, 6: 5.15%, 7 5.38%.

ections were started during the immunological tolerance period in order to
possible incompatibility against γ-globulin. Coincidence of starting sensitization
obulin therapy is more similar to the clinical condition.

Results

n each of the 9 litters on which homologous serum was admin-
d before sensitization with sheep-erythrocytes was started,
erage agglutinin titre of the experimental animals was lower
hat of their controls. The excellent tolerance without signifi-
ortality and absence of noticeable differences in other aspects
ting γ-globulin levels) between both groups, support that
e serum injections *per se* have no interfering influence on the
of the experiment. Other evidences are given by a) absence
erences in antibody titre, if serum injections were given only
the last five days of the experiment, b) constancy of antibody
ne week after interruption of the treatment.

ndependently Dr ROSA PIROVSKY (3) made similar obser
s with C_3 H B/a mice (imbred) These animals were injected
nologous *serum every other day per via* intraperitoneal in
sing doses from 0.3 ml up to 1.2 ml during 15 days totalizing
nd subsequently with 0.2 ml packed sheep erythrocytes. The
ed agglutinin titre of the pooled serum was 1/8 (weekly)
ime the titre of the control group rose up to 1/64 (strongly)

Table I
Anti-sheep erythrocyte agglutinin titre.

ts injected with homologous serum (20 animals) b) Controls (34 animals)

Titre[a]	(20 rats of exptl. group)	b (34 rats of control)
1/16	40%	100 %
1/32	20%	85.5%
1/64	20%	58.8%
1/128	10%	44.2%
1/256	5%	20.6%
1/512	—	5.9%
A Tit.	1/9 (±0.27 tub)	1/78 (±0.17 tub)
Probability + b 0,999		

includes only rats injected since birth. 8 rats, where serum injections were started
before sensitization, the difference to controls was equivalent meantime 4 rats
ceived serum five days after sensitization with sheep-erythrocytes was started,
no diminution of the agglutinin titer

As serum was not inactivated, lower agglutin-titres were interferred by natural
ep haemolysins.

Discussion

In adults plasma normally contains about 1 g γ-globulin per 100 ml (2) This level is approximately the same to that of a great variety of mammals (4) Even during severe undernutrition the antibody forming system maintains its efficiency almost normal (5) Furthermore, in absence of pathological conditions the electrophoretic pattern of geriatric subjects (over age 60) are in the same range as that of the younger group

It has been shown that γ-globulin synthesis depends largely on antigen stimulus. In germ-free animals the concentration of γ-globulin was found very much below the normal level. This state of hypo-γ-globulinaemia gradually disappears when these animals are exposed to the usual microbiological flora (6, 7) On the other hand hyperimmunization and certain pathological conditions may multiply the γ-globulin content.

Nevertheless the constancy of γ-globulin level is difficult to explain without accepting an appropriate regulative mechanism relatively independent of the numerous specific antibody properties. The exposure to antigens is indeed extremely variable, depending on many geographical, climatic and alimentary conditions, as well as the density of population.

If this hypothesis is true, it might be possible to obtain an inhibitory level by massive administration of homologous pooled γ-globulin. Avoidance of stillbirth due to Rh incompatibility seems to be an appropriate self-limited clinical target. Complete disappearance of antibodies *is not necessary* it *merely* has to be prevented that the boost of anti-Rh titre reaches a dangerous level when 7S-γ-globulins are able to cross massively into the fetus.

Anti Rh can cross the placenta at a very early stage of pregnancy Nevertheless there is very little quantitative evidence about the passage of γ-globulin at this time (8) The γ-globulin concentration was found very low in fetuses of 3 to 4 months. MARTIN (9) found virtually no γ-globulin at or before the twenty-sixth week. Progressively the γ-globulin concentration increases steadily towards term, being low in premature infants and reaching a similar level to the mother's shortly before delivery

Incompatibility means capability of fetal red cell destruction. Therefore a relatively high amount of antibodies is required. The delay in crossing the placental barrier the survival of many coated

red cells and the fast renewal of the destroyed red cells are factors which protect fetal life.

Our experimental results reveal a significant diminution of sensitization, encouraging to further investigation. 'Substitutive inhibitory' γ-globulin therapy (10) has to be started as early as possible when incompatibility has been detected. The prolonged life span of 7S globulins do not permit a fast reduction of the titre, and it is doubtful that antibody synthesis can be interrupted completely

Large amounts of γ-globulin up to several times the total body content have been administered in plasma or blood transfusions (i.e. extent burns, haemorrhages) and no information is available about special intolerance to γ-globulin in these cases. Approximately half of intravenous injected γ-globulin disappears from the blood within 24 hours (5) This first phase represents equilibration with extra vascular γ-globulin. Thereafter there is a steady decline which follows an exponential curve with a half time of about 21 to 26 days. With our preparation only 7 S γ-globulin is given in effective doses. Sensitization to homologous γ-globulin antigens may be a cause of ineffectiveness of γ-globulin treatment owing to accelerated removal from the circulation. Methods for easy detection are required, specially when γ-globulin therapy is very prolonged or exists the *antecedent of previous blood transfusions.*

Acknowledgements: We wish to thank Miss CELIA PELLITERO for her conscientious technical assistance and to the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Soc. Balcarce for the regularity and excellent condition of sheep blood delivery

Summary

A pregnant anti-Rh sensitized woman with 'bad history' was treated with massive doses of γ-globulin. Subsequently there was no increase of the antibody-titre until one month after delivery of Rh-positive healthy boy These results are parallel to the diminution of anti-sheep red cell agglutinin production in rats (and mice) injected regularly with high quantities of homologous serum. Therefore substitutive-inhibitory γ-globulin treatment seems to be useful in preventing stillbirth due to materno-fetal blood incompatibility

Zusammenfassung

Eine schwangere, Rh-sensibilisierte Frau, deren letztes Kind eine schwere Erythroblastose durchmachte, wurde mit hohen Dosen γ-Globulin behandelt. Die Antikörper Konzentration blieb unverändert und erhöhte sich erst einen Monat nach der Geburt eines gesunden Rh-positiven Jungen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Verminderung von anti-Schaf-Erythrocyten-Agglutininen bei Ratten (und Mäusen) überein, die während der Sensibilisierung mit großen Mengen homologen Serum gespritzt wurden. Aus diesem Grunde scheint die substitutiv-inhibitorische γ-Globulin-Behandlung nützlich zur Verhütung der Totgeburt durch Blutunverträglichkeit zu sein.

Résumé

Une femme enceinte, sensibilisée contre le facteur Rh, dont le dernier enfant avait souffert d'une grave érythroblastose, fut soignée à hautes doses de γ-globulin. La concentration des anticorps resta inchangée, mais s'accrut un mois après la naissance. Ce résultat accorde avec la diminution d'agglutinines anti-érythrocytaires de mouton chez des rats et des souris à qui on avait injecté du sérum homologue en grandes quantités pendant la sensibilisation. C'est pour cette raison que le traitement substitutif-inhibiteur à la γ-globuline semble être utile pour prévenir la mort fétale due à l'incompatibilité sanguine.

References

1. Rewald, E. Substitutive-inhibitory therapy in constitutional non spherocytic erythrocytic disease. Acta haemat. *31*: 303 (1964)
2. Mollison, P. L. Blood Transfusion in Clinical Medicine, p. 42, 605 (Blackwell, Oxford 1961).
3. Pirovsky Rosa R. de Pers. inform.
4. Altman, P. Blood and other Body Fluids. Biological Handbooks, Fed. Amer. Soc. exp. Biol.
5. Humphrey J. and White, R. Immunology for Students of Medicine, 2nd ed., p. 116 (Blackwell, Oxford 1964).
6. Gustafsson, B. and Laurell, C. γ-globulin production in germ-free rats after bacterial contamination. J. exp. Med. *110*: 675 (1959).
7. Wostmann, B. and Gordon, H. Electrophoretic studies on the serum protein pattern of the germ-free rat and its changes upon exposure to conventional bacterial flora. J. Immunol. *84*: 27 (1960).
8. Moore, D.; Dupan M. and Buxton, C. An electrophoretic study of maternal, fetal and infant sera. Amer. J. Obstet. Gynec. *57*: 312 (1949).
9. Martin N. A γ-globulinaemia – congenital defect. Lancet ii. 1094 (1954).
10. Lewi, S. et Mayer, M. Essai d'inhibition de la formation d'anticorps par substitution de γ-globulines. Presse méd. (Paris) *69*: 105 (1961)

Author's address: Dr. E. Rewald, Corrientes 3330, *Mar del Plata* (Argentina).

Acta haemat. 30: 215–227 (1963).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik des Kantonsspitals Zürich
(Direktor: Prof. P. H. Rossier)

Eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangels*

Von P. G. Frick, F. Bachmann und J. R. Schmid

Kongenitale Methämoglobinämien werden pathogenetisch in zwei Gruppen eingeteilt. Bei der ersten Gruppe ist die fermentative Rückreduktion von Methämoglobin beeinträchtigt, bei der zweiten ist die Struktur des Hämoglobins abnorm. Bis heute ist nur eine einzige fermentative Störung bekannt geworden, die zur spontanen Methämoglobinämie führt: der Diaphorasemangel. Hingegen sind in neuerer Zeit mehrere abnorme Hämoglobine entdeckt worden, deren gemeinsames Charakteristikum Methämoglobinämie ist. Diese Hämoglobine bezeichnet man als Hb M (5, 19–21, 25, 28, 36, 41, 44).

Im folgenden wird über Untersuchungen einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangels berichtet**.

Methoden

Das Methämoglobin (Met-Hb) wurde bestimmt nach der Methode von Evelyn und Malloy (17) mit einem Coleman-Spektrophotometer. Nach Zusatz von KCN wurde die Aufhellung bei 630 mμ gemessen. Für die Untersuchung der beiden physiologischen *Mechanismen der Methämoglobin-Rückreduktion* wurde das *Hämoglobin* zuerst durch Behandlung mit Natriumnitrit in einem NaCl-Phosphat-Puffer (pH 7,3) nach der Methode von Betke (4) praktisch vollständig in Methämoglobin umgewandelt. Anschließend wurden 3 ml der gewaschenen Erythrocyten in isotonischer NaCl-Phosphat-Lösung bei 37 °C aufgeschwemmt. Aus dieser Suspension wurde eine Versuchsreihe angesetzt mit 5% Glukose, 5% Glukose + Methylenblau, 5% Natriumlaktat und 5%

* Diese Untersuchung wurde dank der Unterstützung der Sandoz-Stiftung zur Förderung der Medizinisch-biologischen Wissenschaft ermöglicht.

** Herrn Dr. H. Fellmann, Luzern, und Herrn PD Dr. F. Schaub sei für die Überweisung des Patienten F. H., welche zur eingehenden Abklärung der Sippschaft führte, bestens gedankt.

Laktat + Methylenblau. Die Ansätze mit Glukose dienen der Untersuchung der aeroben, TPNH-abhängigen Met-Hb-Rückbildung über den Hexosemonophosphatshunt (Abb. 1) diejenige mit Laktat der Untersuchung des anaeroben, DPNH-abhängigen Mechanismus (Abb 2). Der Met-Hb-Gehalt wurde nach 1½- und 4stündiger Inkubation bestimmt. Die bei 10 Kontrollen ermittelten Normalwerte sind in Tab. 1 dargestellt.

Die Bestimmung der *Erythrozyten-Diaphorase* erfolgte nach der Methode von Scott (45) Die Bestimmung der *Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase* (G-6-PD) wurde nach der Methode von Kornberg *et al.* (29) durchgeführt. In einzelnen Fällen wurde ferner die *Glutathion-Stabilität* nach der Methode von Beutler (7) modifiziert nach Ross (39) bestimmt.

Das *Absorptionsspektrum* des Blutfarbstoffs wurde vergleichend im Oxyhämolysat, Methämolysat und Cyanmethämolysat, gepuffert bei pH 5,3 6,6 und 8,3 im Beckman-DU-Spektrophotometer aufgenommen.

Resultate

Die Abklärung der seit Geburt bestehenden Cyanose der beiden Brüder F H (III/6) und F E. (III/8) führte zur Feststellung einer Sippschaft mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangel (Abb 3) Die Familienuntersuchung umfaßt 58 Mitglieder aus 4 Generationen, bei denen in 27 Fällen eine allgemeine hämatologische und eine eingehendere Untersuchung der Erythrozytenfermente ausgeführt wurde. In allen 27 Fällen wurden Bestimmungen von Met Hb und Diaphorase vorgenommen, in 9 Fällen der Met Hb-Rückreduktionstest nach Betke (4) in 6 Fällen die G-6-PD und in 4 Fällen die Glutathion-Stabilitätsbestimmung nach der Methode von Beutler (7) Bei Fall III/6 wurden ferner spektralanalytische Untersuchungen des Hämoglobins vorgenommen. Bei der Mutter (II/3) der cyanotischen Brüder sowie bei ihren vier direkten Nachkommen (III/4 6, 8 und 9) und bei allen 14 Nachkommen zweiten Grades konnte durch die Bestimmung der Blutgruppe, die ohne Ausnahme A/Rh/positiv war die Signifikanz der genealogischen Untersuchung bestärkt werden Eine Blutverwandschaft konnte nicht eruiert werden die weiteren Vorfahren (I/1–4) stammen aus vier verschiedenen Gemeinden der Innerschweiz (Hasliberg Kerns, Alpnach und Sarnen Wiler) eine Blutsverwandschaft von II/3 und II/4 ist somit unwahrscheinlich. Unter den Mitgliedern der Generationen I und II welche bäuerliche Berufe ausübten und im allgemeinen ein höheres Alter erreichten, sind keine weiteren Fälle von Cyanose bekannt.

Der von verschiedenen Autoren festgestellte autosomale und rezessive Erbgang des Leidens wurde bestätigt. Die Familienmitglieder werden im folgenden entsprechend ihrer genetischen Einteilung besprochen.

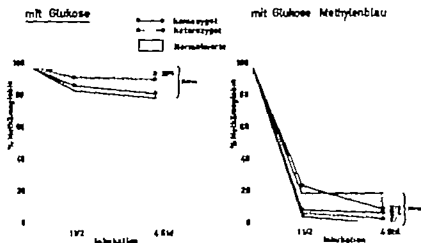


Abb. 1 Ergebnisse der Methämoglobin-Rückreduktion mit Glukose und Glukose + Methylenblau bei den homozygoten und heterozygoten Mitgliedern der Familie.

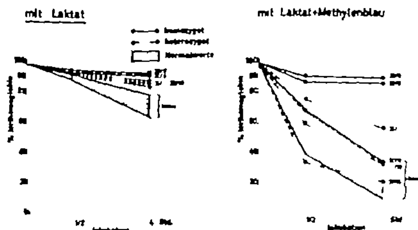


Abb. 2. Untersuchung des anaeroben, DPN-abhängigen Weges der Methämoglobin-Rückreduktion mit Laktat und Laktat + Methylenblau.

Homozygote Mitglieder

Fälle mit pathologisch erhöhtem Methämoglobingehalt und stark erniedrigter Erythrozyten Diaphorase sind homozygote Träger der Krankheit (42)

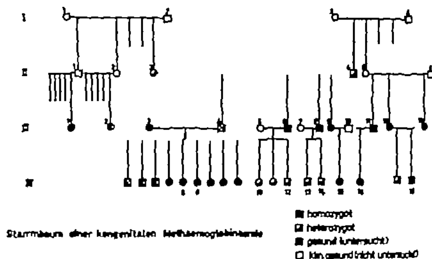


Abb. 3. Die untersuchte Sippschaft von homozygoten und heterozygoten Trägern der kongenitalen Methämoglobinämie.

Fall III/6 (F. H. ♂ geb. 1922): Der Patient war seit Geburt cyanotisch, ohne jedoch in seiner körperlichen Leistungsfähigkeit beeinträchtigt zu sein. Die 1961 durchgeführte Untersuchung ergab einen völlig normalen klinischen Status, mit Ausnahme der Cyanose. Herz und Lungen unauffällig, BD 130/80, Thoraxaufnahme und EKG o. B. Senkung 2 mm/Std., Hämoglobin 18,6 g% aktives Hämoglobin 11,1 g% inaktives Hämoglobin 7,5 g% Gehalt an Methämoglobin 38,8% (spektrophotometrisch), Erythrocyten 5820000, Farbeindex 1,0, Hämatokrit 45,5% Retikulocyten 10‰, keine Innenkörper Leukocyten 6600 mit normaler Verteilung, Thrombocyten 152000. Im Sternalmark leicht gesteigerte Erythropoese. Die O_2-Dissoziationskurve war nach links verschoben (Abb. 4) Serumeisen 125 γ% Bilirubin total 1,0 und direkt 0,1 mg%, osmotische Resistenz der Erythrocyten und Urinanalyse im Bereiche der Norm. Die Erythrocyten-Diaphorase mit 1,7 Δ OD/Min/mg Met-Hb war deutlich erniedrigt (normal 5,5–8,4). Untersuchungen auf ein abnormales Hämoglobin (Elektrophorese, Chromatographie, Alkali-Denaturierung) und Bestimmungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität fielen normal aus. Dagegen war beim Met-Hb-Rückreduktionstest die Rückbildung mit Laktat und Laktat + Methylenblau deutlich vermindert (Abb. 2). Das Absorptionsspektrum des Oxyhämolysates des Patienten wies eine Hebung bei 630–635 mμ auf (Abb. 5), die mit KCN vollständig aufgehoben wurde. Dieses Verhalten ist typisch für die kongenitale Form der Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangel.

Fall III/8 (F. E. ♂ geb. 1924): Seit Geburt ausgeprägte Cyanose, sonst frühere Anamnese ohne Belang. Status, besonders Herz und Lungen o. B. Hämoglobin 18,1 g% Hämatokrit 55%, Met Hb 17,3% (spektrophotometrisch) und Erythrocyten-Diaphorase 1,6 Δ OD/Min/mg Met Hb. Beim Met-Hb-Rückreduktionstest nur sehr geringe Rückbildung mit Laktat und Laktat + Methylenblau (Abb. 2), dagegen normale Werte mit Glukose (Abb. 1). Die Bestimmungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität waren im Bereiche der Norm.

Heterozygote Mitglieder

Fälle mit normalem Gehalt an Methämoglobin, jedoch einer Verminderung der Erythrozyten-Diaphorase in einem mittleren Bereich (2,8–4,8 Δ OD/Min/mg Met Hb) sind heterozygote Träger des Enzymdefektes (48). Es handelt sich um die direkten Vorfahren und Nachkommen sowie um zwei entferntere Verwandte der väterlichen Linie der beiden homozygoten Probanden (Abb. 3)

Fall II/3 (geb. 1886) Die Mutter der homozygoten Brüder ist gesund und nicht cyanotisch. Hämoglobin 14,4 g%; Leukozytenzahl sowie Differentialbild und osmotische Resistenz der Erythrozyten normal. Met-Hb 1,45%. Die Diaphorase ist deutlich erniedrigt (2,8 Δ OD/Min/mg Met Hb). Bei der Met-Hb-Rückreduktion erfolgte ein nur geringer Abfall auf Zusatz von Laktat und Laktat + Methylenblau, so daß die Werte in einen mittleren, noch pathologischen Bereich zu liegen kommen (Abb. 2). Untersuchungen der G-6-PD und der Glutathionstabilität waren im Bereiche der Norm.

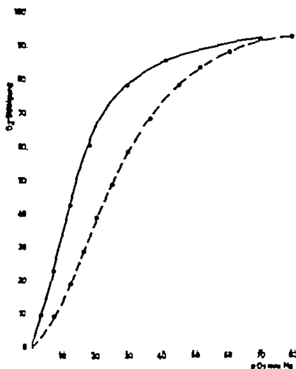


Abb. 4 Die O_2-Dissoziationskurve eines homozygoten Patienten mit kongenitaler Methämoglobinämie (Fall III/6) (—) verglichen mit einer gesunden Kontrollperson (o——o).

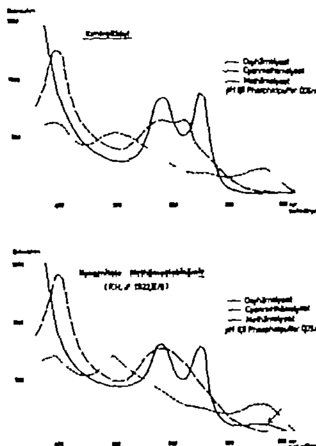


Abb. 5. Spektrophotometrische Messungen der Extinktion im Oxyhämolysat, Cyanmethämolysat und Methämolysat bei einem Kontrollblut und einem homozygoten Fall (Nr. III/6) von kongenitaler Methämoglobinämie. Bei der Methämoglobinämie liegt ein breites Absorptionsmaximum bei 630 mμ im Oxyhämolysat vor, welches auf Zusatz von KCN verschwindet.

Fall II/4 (geb. 1877) Der Vater der erkrankten Geschwister kam im 68. Lebensjahr an einem Herzinfarkt ad exitum. Er war nicht cyanotisch. Aus genealogischen Gründen muß er ein heterozygoter Träger gewesen sein. Eine Bestätigung dafür ist der Nachweis von zwei heterozygoten Nachkommen der entfernteren väterlichen Linie (III/13 und IV/17).

Fall III/12 (geb. 1912) Klinisch gesund, Met-Hb 0,57%, Diaphorase 4,6 Δ OD/Min/mg Met Hb.

Fall IV/10 (geb. 1945) Klinisch gesund, Hämoglobin 13,7 g%, Met-Hb 0,5% und Diaphorase 3,5 Δ OD/Min/mg Met-Hb. Die Met Hb-Rückreduktion mit Glukose und Laktat sowie die G-6-PD waren normal.

Fall IV/11 (geb. 1950) Klinisch gesund, Hämoglobin 14,4 g%, Met-Hb 0,5%, Diaphorase 4,1 Δ OD/Min/mg Met Hb, normale G-6-PD und Met-Hb-Rückreduktionen mit Glukose und Laktat.

Tabelle I

Ergebnisse der Methämoglobin- und Enzym-Bestimmungen der Sippschaft.

Fall Genotypus	Nr.	Met-Hämoglobin %	Diaphorase Δ OD/Min/mg Met-Hb	Methämoglobin-Rückreduktion (nach Betke) Prozent reduziertes Methämoglobin nach Inkubation mit: Glukose		Glukose und Methylenblau		Laktat		
				1½ h	4 h	1½ h	4 h	1½ h	4 h	1
Normalwerte	10 Fälle	1,0	5,3–8,4	85–100	80–100	5–20	0–20	90–95	65–80	4
homozygote	III/6	38,8	1 7	97	95	25	7,5	93,5	95	9
	III/8	17,3	1,6	88	83	9	9	95,5	94	8
	II/3	1 45	2,8	93,5	92	7,5	4	89,5	87,5	7
	III/12	0,57	4,6							
	IV/10	0,5	3,5	92	89,5	4,5	8,5	88	78,5	6
heterozygote	IV/11	0,5	4,1	89	86	7	6	89	85	6
	IV/12	0,5	4,8							
	IV/13	0,99	3,9							
	IV/14	0,74	5,3					92,5	92	[illegible]
	IV/17	0,85	4,1							
	III/1	0,82	6,4							
	III/2	0,73	5,5							
	III/4	1,02	5,4	94,5	93	12	7	84,5	71,5	4
	III/9	0,94	6,6					94,5	92	1
	III/11	1,02	5,0							
	III/13	1,02	5,3							
	IV/1	0,7	5,6							
normale	IV/2	0,7	7,3							
	IV/3	0,7	6,1							
	IV/4	0,5	6,9							
	IV/5	0,5	6,0							
	IV/6	0,5	6,6							
	IV/7	1,0	5,3							
	IV/8	0,6	6,0							
	IV/15	0,6	5,8							
	IV/16	0 71	6,2							
	IV/18	0,62	5,3							

Fall IV/12 (geb. 1956) Klinisch gesund, Hämoglobin 16,0 g% Met-Hb 0,5% Diaphorase 4,8 Δ OD/Min/mg Met-Hb.

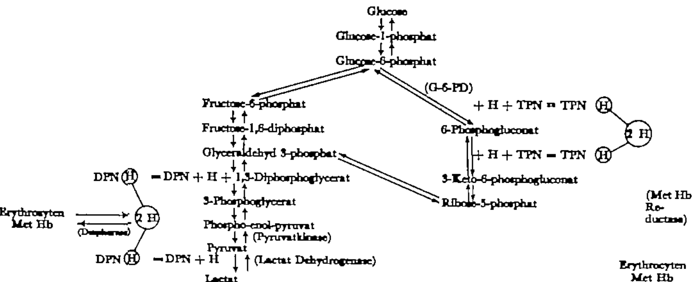
Fall IV/13 (geb. 1957) Klinisch gesund, Met Hb 0,99% Diaphorase 3,9 Δ OD/Min/mg Met-Hb.

Fall IV/14 (geb. 1961) Dieses Kind hatte wegen einer Anämie (Hämoglobin von 10 2 g%) Eisen per os erhalten. Anschließend, im Zeitpunkte der Untersuchung, waren Hämoglobin 13,4 g%, Erythrocyten 5,2 Mill., Färbeindex 0,81 Retikulocyten 23‰, Met-Hb 0,74% und Diaphorase 5,3 Δ OD/Min/mg Met Hb.

Fall IV/17 (geb. 1945) Klinisch gesund, Met-Hb 0,85%, Diaphorase 4,1 Δ OD/Min/mg Met Hb.

Tabelle II

Schema der Erythrocyten-Glykolyse.



Gesunde Mitglieder

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, wurden bei 17 Mitgliedern der Sippe normale Werte für Methämoglobin und Erythrozyten Diaphorase gefunden. Die zwei Geschwister (III/4 und III/9) der cyanotischen Probanden und ihre sämtlichen Nachkommen (IV/1–9 und IV 15–16) waren keine Träger des Enzymdefektes.

Diskussion

Bei jedem Patienten mit einer seit frühester Kindheit bestehenden Cyanose ohne Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit muß die Verdachtsdiagnose einer kongenitalen Methämoglobinämie gestellt werden (32 33) Wie eingangs erwähnt, sind heute zwei pathogenetisch verschiedene Gruppen kongenitaler Methämoglobinämien bekannt der einen liegt eine Fermentstörung zugrunde (8–10 14–16, 18, 23 35 37 42, 43 45–47) der anderen abnorme Hämoglobine (sog Hb M) Die Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangel ist schon bei der Geburt manifest. Der Enzymdefekt wird rezessiv die bisher genetisch abgeklärten Hämoglobine M werden dominant vererbt. Die spektrometrische Trennung der beiden Methämoglobine ist relativ einfach. Das durch Diaphorasemangel bedingte Met Hb entspricht dem durch Oxydation von normalem Hämoglobin A erhältlichen Met Hb A. Es besitzt ein Absorptionsmaximum bei 630 mμ, welches durch Zusatz von KCN verschwindet (18) Ascorbinsäure (2) und Methylenblau reduzieren Met Hb A, während Met Hb M nicht beeinflußt wird.

Die bei den cyanotischen Probanden (III/6 und III/8) ausgeführten Untersuchungen ergaben die für einen Diaphorasemangel typischen Befunde. Die Ursache des chronisch erhöhten Met Hb-Wertes ist die ungenügende Rückreduktion des konstant anfallenden Met Hb (40) Bei normaler Hämoglobin-Struktur wird dieser Prozeß durch die intraerythrozytäre Glykolyse gewährleistet (1 24 26, 31 34) Die Reduktion erfolgt zu ca. 92% über die anaerobe Glykolyse und zu ca. 8% über den aeroben Hexosemonophosphat Shunt (13) Im ersten Falle ist die Reduktion des Met Hb von DPNH abhängig, im zweiten von TPNH (Tab. II) Da die Reduktion mit DPNH durch die Diaphorase vermittelt wird, führt eine Insuffizienz zu einem Anstieg an Met Hb. Damit wird auch die deutlich verminderte oder fehlende Rückreduktion von Met Hb mit Laktat oder Laktat + Methylenblau erklärt, bei welcher DPNH

und Diaphorase beteiligt sind (22) Die Rückreduktion mit Glukose verläuft hingegen normal, weil die TPNH abhängige Reaktion *ohne Diaphorase erfolgt (11 12) Die beschleunigende Wirkung* von Methylenblau auf die Reduktion mit Glukose führt sogar zu einer nahezu totalen Umwandlung von Met Hb zu Hb. Diese Beobachtung bildet die Grundlage der Behandlung des Leidens.

Der Fermentdefekt muß relativ schwer sein bis eine Störung eintritt ein mittlerer Abfall der Aktivität, wie dies bei den heterozygoten Merkmalträgern vorliegt, führt nicht zur Methämoglobinämie. Deshalb ist es auch nicht möglich, Heterozygote durch die Bestimmung des Met Hb zu erfassen. Erst die Einführung ferment spezifischer Methoden ermöglichte es 1960 SCOTT *et al.* (42) heterozygote Familienglieder zu ermitteln die Diaphoraseaktivität der Heterozygoten lag zwischen den bei Homozygoten und Normalen ermittelten Werten. Bei der oben beschriebenen Familie konnte in ähnlicher Weise eine partielle Verminderung der Diaphorase bei der noch lebenden Mutter den 5 direkten Nachkommen der beiden cyanotischen Probanden und zwei entfernteren Nachkommen der väterlichen Linie (Tab I) festgestellt werden. Nur in einem Fall (IV/13) war die Diaphorase mit 5,8 Δ OD/Min/mg Met Hb im unteren Bereiche der Norm. Dieser 3jährige Knabe wurde während der Enzymuntersuchung für eine Eisenmangelanämie behandelt, so daß offenbar eine junge, regenerierende Erythrozytenpopulation vorlag, deren Gehalt an Diaphorase sowie anderer Enzyme etwas höher liegt als in normalen, mehr gealterten Zellen (3 4 30)

Eine weitere Möglichkeit, heterozygote Träger nachzuweisen wurde von BERKE *et al.* (6) im Methämoglobin-Reduktionstest mit Laktat geprüft. Die genannten Autoren fanden intermediäre Werte bei Heterozygoten. Die eigenen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse nur teilweise reproduzieren, obschon die Rückreduktion des Patientenblutes immer am Tage der Blutentnahme gleichzeitig mit einem Kontrollblut durchgeführt wurde. Wie aus Tab. I und den Abb. 1 und 2 hervorgeht, konnte eine verminderte Rückreduktion mit Laktat und auch mit Laktat + Methylenblau nur bei der Mutter (II/3) erhalten werden, bei den untersuchten direkten Nachkommen war sie hingegen im Grenzbereich oder normal.

Die symptomatische Behandlung der Methämoglobinämie besteht in der Verabreichung von reduzierenden Substanzen. Methylenblau i v wirkt rasch und eindeutig, Vitamin C per os

langsamer und nicht so intensiv. Die perorale Behandlung genügt jedoch, um die ästhetischen Aspekte des Leidens zu korrigieren. Trotz der oft beobachteten kompensatorischen Polyglobulie sind von dieser Seite keine Komplikationen bekannt, und die Prognose des Leidens ist gut.

Zusammenfassung

Diese Untersuchung betrifft 27 Mitglieder einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie. Dabei wurden zwei cyanotische Brüder mit sehr tiefer Erythrocyten-Diaphorase als homozygote und 7 direkte Vorfahren oder Nachkommen und 2 entferntere Verwandte der väterlichen Linie mit einer Verminderung der Diaphorase auf einen mittleren Bereich bei *normalem Methämoglobin-Gehalt* als *heterozygote Träger* des Leidens erfaßt.

Summary

This study concerns 27 members of family with congenital methemoglobinemia. Two cyanotic brothers with low red cell diaphorase were found to be homozygous carriers of the genetic defect. In 7 direct descendents and in 2 remote paternal relatives without cyanosis, heterozygous inheritance was ascertained by reduction of red cell diaphorase to an intermediate level.

Résumé

27 membres d'une famille atteinte de methémoglobinémie congénitale font l'objet de cette étude. Chez 2 frères cyanotiques ayant un taux de diaphorase érythrocytaire très bas se trouva la forme homocygote de cette maladie et chez 7 de leurs descendants directs, ainsi que chez deux parents éloignés du côté paternel, la forme hétérocygote, se manifestant par une réduction moyenne de la diaphorase, le taux de methémoglobine restant normal.

Literatur

1. AMMUNDSEN, E. Studies on the presence of non-carbon monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood. Chem. *138:* 563 (1941)
2. BARCROFT H.; GIBSON, Q. H.; HARRISON, D. C. AND MCMURRAY J. Familial idiopathic methemoglobinemia and its treatment with ascorbic acid. Clin. Sci. *5:* 145 (1945)
3. BERNSTEIN, R. E. Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of the red-cells. J. clin. Invest. *38:* 1572 (1959).
4. BETKE, K.; BALTZ, A.; KLEIHAUER, E. UND SCHOLZ, P. Methämoglobingehalt, Methämoglobinreduktion und Sauerstoffverbrauch in jungen und alten Erythrocyten. Blut 6. 203 (1960).
5. BETKE, K.; *GRÖSCHNER, E. und BOCK, K. Properties of further variant of Haemoglobin M.* Nature (London) *188:* 864 (1960)
6. BETKE, K.; STEIN, H. UND TÖNZ, O. Untersuchungen einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie durch Reduktaseinsuffizienz. Dtsch. med. Wschr. *87* 65 (1962)
7. BEUTLER, E. The glutathione instability of drug sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. J. Lab. clin. Med. *49:* 84 (1957)

8. Bodm, L.: Fälle von familiärer Methämoglobinämie aus zwei Sippen. Inaug. Diss. Ann. paediat. 201 455 (1963).
9. Bolt W.; Zeelett G. und Ritzl, F. Die kongenitale Methämoglobinämie und ihre Bedeutung bei der Differentialdiagnose der Zyanose. Dtsch. med. Wschr. 88: 2247 (1963).
10. Barakat V K., Gibson Q.H. and Harrison, D. C. Familial idiopathic methemoglobinemia. Lancet 260: 935 (1951).
11. Brewer, G. J. Tarlov A. R. and Alving, A. S. The methemoglobin reduction test for primaquine type sensitivity of erythrocytes. J. amer. med. Ass. 180: 386 (1962).
12. Brewer, G. J. Tarlov A. R. and Alving, A. S. Methemoglobin reduction test. Bull. Org. mond. Santé 22: 633 (1960).
13. Cartier, P et Bouchard, M. Le métabolisme phosphoré des érythrocytes. III. La glycolyse des globules rouges humaines. Revue franç. et clin. biol. 8. 395 (1963).
14. Cawein, M. Behlen, C. H. and Lappat E. J. A study of methemoglobinemia due to congenital diaphorase deficiency. J. Lab. clin. Med. 60: 866 (1962).
15. Codounis, A. A genetic study of the hereditary methaemoglobinic cyanosis. Acta genet. stat. med. 7 131 (1957).
16. Eder, H. A. Finch, C. and McKee, R. W.: Congenital methemoglobinemia. A clinical and biochemical study of case. J. clin. Invest. 28: 265 (1949).
17 Evelyn, K. A. and Malloy H. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin in a single sample of blood. J. biol. Chem. 126. 655 (1938).
18. Finch, C. A. Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. New Engl. J. Med. 239: 470 (1948).
19. Gerald, P. S. The electrophoretic and spectroscopic characterization of haemoglobin M. Blood 13. 936 (1958).
20. Gerald, P. S. Cook, C. D. and Diamond, L. K. Hemoglobin M. Science 125. 300 (1957).
21 Gerald, P. S. and George, P. Second spectroscopically abnormal methemoglobin associated with hereditary cyanosis. Science 129: 393 (1959).
22. Gibson, Q. H. The reduction of methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia. Biochem. J. 42: 13 (1948).
23. Gibson, Q. H. and Harrison, D. C. Familial idiopathic methemoglobinemia. Five cases in one family. Lancet 6. 941 (1947).
24 Gruneau, F. und Löhr, G. W. Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin. Wschr. 38. 796 (1960).
25. Hansen, H. A. Jagenburg, O. R. and Johansson, B. G. Studies on an abnormal hemoglobin causing hereditary congenital cyanosis. Acta pediat. 49: 503 (1960).
26. Hill, A. S. Haut A. Cartwright G. E. and Wintrobe, M. M. The role of nonhemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro. J. clin. Invest. 43. 17 (1964).
27 Hörlein, H. und Weber, G. Über chronische, familiäre Methämoglobinämie und eine neue Modifikation des Methämoglobins. Dtsch. med. Wschr. 73. 476 (1948).
28. Josephson, A. M. Weinstein, H. G.; Yakulis, V. J.; Singer, L. and Heller, P. A new variant of hemoglobin M disease. Hemoglobin M Chicago. J. Lab. clin. Med. 59: 918 (1962).
29. Kornberg, A. and Horecker, B. L.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Colowick' and Kaplan' Methods in Enzymology vol. I 323-327 (Academic Press, New York 1955).
30. Löhr, G. W. Waller, H. D. Karges, O. und Schlegel, B.: Beziehungen zwischen Zellstoffwechsel und Zelltod von in-vivo- und in-vitro-alternden Erythrocyten. Proc. 7th Int. Congr. Rome 1958 (Karger, Basel / New York 1959).
31. Malkin, A. and Denstedt O. F. The metabolism of the erythrocyte. X. The inorganic pyrophosphatase of the erythrocyte. Canad. J. Biochem. 34 121 (1956).

32. Marti, H. R.: Hereditäre Enzymdefekte der Erythrozyten. Schweiz. med. Wschr 92: 1430 (1962)
33. Marti, H. R.: Normale und anomale menschliche Hämoglobine, p. 197 (Springer Berlin/Göttingen/Heidelberg 1963)
34. Mills, G. C. and Randall, H. P. Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. J biol. Chem. 232: 589 (1958).
35. Newcomb, C. P. and Dawson, J. Two cases of congenital methaemoglobinaemia. Brit. med. J I: 1396 (1958)
36. Pisciotta, A. V. Ebbe, S. N. and Hinz, J. E. Clinical and laboratory features of two variants of methemoglobin M disease. J Lab. clin. Med. 54: 73 (1959)
37. De Prez, H. E. and Hickman, M. J. Familial congenital methemoglobinemia. Report of case and family study. Ann. intern. Med. 51: 1078 (1959)
38. Ross, J. D.: Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. Blood 21: 51 (1963).
39. Ross, J. D. and Desforges, J. F. Reduction of methemoglobin by erythrocytes from cord blood. Pediatrics 23: 718 (1959)
40. Rossi-Fanelli, A. Antonini, E. and Mondovi, B. Ferrihemoglobin reduction in normal and methemoglobinemic subjects. Clin. chim. Acta 2. 476 (1957).
41. Barawi, E. Hofmann, H. und Betke, K. Sporadisches Auftreten von Hb M (Boston Typ?) in einer mitteldeutschen Familie. Schweiz. med. Wschr. 92: 1090 (1962).
42. Scott E. M. The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. J clin. Invest. 39: 1176 (1960)
43. Scott E. M. and Griffith, I. V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase. Biochem. biophys. Acta 34: 584 (1959)
44. Shibata, S. Tamura, A. Iuchi, I. and Takahashi, H. Hemoglobin M. Demonstration of new abnormal hemoglobin and hereditary nigremia. Acta haemat. jap. 23: 96 (1960).
45. Townes, P. L. and Lovell, G. R. Hereditary methemoglobinemia. A new variant exhibiting dominant inheritance of methemoglobin A. Blood 18: 18 (1961).
46. Townes, P. L. and Lovell, G. R. Investigations of the defect in a variant of hereditary methemoglobinemia. Blood 19: 60 (1962)
47. Waller, H. D. und Löhr, G. W. Enzymdefekt bei angeborener Methämoglobinämie. Folia haemat. N. F. 6: 73 (1961)

Adresse der Autoren: Prof. P. G. Frick, Dr. F. Bachmann und Dr. J. R. Schmid, Medizinische Univ.-Klinik, Kantonsspital, Zürich (Schweiz).

Acta haemat. 34 228–238 (1965).

The T ylor Research Laboratories, Children's Hospital, Sheffield; and University Maternity Hospital, Alexandra Athens

Human Bone Marrow During the Last Three Months of Intrauterine Life

A Histological Study

By Pitsa K. Kalpaktsoglou and J L. Emery

The bone marrow of the human foetus has been studied in many ways (1 2 3 4) These studies have either involved bone marrow aspirations (5 6, 7) or gross manipulation of bones of the dead foetus or infant (8) We have found no attempt to study this subject using quantitative estimates of the cells of the marrow tissue done on sections of identical marrow samples from foetuses. The only approach possible is to examine children born at different ages of gestation and in whom the premature birth has been due to accident and not disease.

Ribs have been used by several workers for the study of bone structure and development (9 10 11 12) one of the chief advantages of the rib being it's relative uniformity of structure. The rib also appears to be the best bone for histological study of the marrow as the wall of the rib in the foetus is so thin that adequate fixation of the marrow takes place rapidly through it.

This paper records an attempt by use of the rib, to estimate the type and number of cells in the marrow of the rib during the latter half of pregnancy

Material and Methods

The bones used came from a file of ribs from over 2,500 foetuses and infants that have been collected over period of 10 years as part of the routine necropsy procedure of the Children's Hospital, Sheffield. The method of collection and processing has been as follows:

The cartilage of the 4th rib of the right chest is cut at pproximately low from the costochondral junction and the shaft of the rib at about the mid point between the sternum and spine. After trimming excess muscle, the rib is fixed in 10% formal saline

for few days. Then the edges of the rib are trimmed back, cutting with an extremely sharp knife, from the cartilage to the shaft. This produces block of about 5 mm thickness, exposing marrow on both sides and occupying the centre of the rib and at right angles to the costochondral junction. After fixation for few more days, the rib is decalcified in 5% nitric acid after which the shaft of the bone is trimmed to about 5 cm from the cartilage.

After routine processing, 5μ sections are cut across the marrow face and stained by variety of methods, including Masson's trichrome and Giemsa. Neutral formal saline was used as fixative rather than Zenker or Bouin as, in our hands, the latter fixatives produced no better results than formal saline.

An earlier study had been done on series of selected normal ribs. Transverse strips of rib at intervals of 2 mm from the costochondral junction were drawn and the tissues and cells counted. This showed that at a distance of 5 mm from the cartilage, the bone marrow had reached full cellularity and showed least variation in cell content (15).

For the present study very careful selection of ribs from the total series available was made, the ribs being selected in the following way:) Only ribs from children stillborn or dying within 5 hours of birth were used. b) Any rib showing any abnormality of the costochondral junction was excluded. c) If there was any history of toxaemia of pregnancy diabetes, or any other disease in the mother the rib was also excluded.

This selection meant that exclusion of very large number of children including the majority of children that normally come under the heading of 'prematures' and thus, the ribs used came from children who had apparently died due to virtual accidental causes or illness of such short duration as to produce no recognisable pathological lesions. From well over thousand postmortem ribs and tissues studied, only 56 apparently completely normal ribs were found. This selection was made before any of the quantitative studies were carried out.

The sections were studied in the following way A thin line was drawn across the coverslip of the section parallel to the costochondral junction and exactly 5 mm from it. The rib was projected on to Bristol board, through standardised projection microscope. On the board, pair of parallel lines at 2 cm distance had been drawn in Indian ink. A complete tracing across the whole width of the rib was made, mapping out all the rib structures including the capillary walls surrounding the cellular marrow tissues, the cartilage, bone and periosteum. The distinction between the vessel walls and the marrow tissue was very rarely in doubt, being much more obvious than is the case with normal adult marrow

When the strip had been mapped out, nuclear count was done of the marrow cells in the tissues mapped within the parallel lines, the number of nuclei being written into the areas. The pieces of paper were then cut out and the marrow areas weighed, from hich, using the weight of cut-outs done from micrometer scales, the areas of the different tissues were calculated.

The rib section was then transferred to the ordinary microscope and under the oil immersion, using hair-line eyepiece, differential count was carried out across the identical area to that drawn and cut out. Counts were only carried out on sections that were stained satisfactorily and in which the cell differentiation could be made with confidence. This necessitated the exclusion of one case.

The erythroid cells were divided into two groups, depending upon the size of the cells, normoblasts and macronormoblasts. Further differentiation was not possible.

Differential counts were done by several observers and showed no greater lack of consistency than counts done on routine fresh marrow smears.

The cases were grouped for purposes of analysis in two ways. The stillborns, together with the babies dying within 5 hours of birth, were grouped into 5 categories based on crown rump length; group I being 14 to 22.5 cm, group II 22.6 to 27.5 cm, group III 27.6 to 31.5 cm, group IV 31.6 to 35.5 cm, and group V 35.6 to 39 cm.

Table I

The amount of tissue measured (sq mm) in rib sections from stillborns of different maturities.

No. of cases	C. R. length in cm range and mean		Total	Marrow	Vessels	Cartil.	[illegible]	[illegible]
10	14 –22.5	Mean	0.105	0.032	0.021	0.026	0.010	[illegible]
	(19.4)	S.D	0.020	0.010	0.008	0.007	0.002	[illegible]
		S.E.	0.006	0.003	0.003	0.002	0.001	[illegible]
10	22.6–27.5	Mean	0.137	0.050	0.023	0.035	0.009	[illegible]
	(25.5)	S.D	0.024	0.013	0.008	0.014	0.003	[illegible]
		S.E.	0.008	0.004	0.003	0.004	0.001	[illegible]
11	27.6–31.5	Mean	0.153	0.052	0.024	0.033	0.011	[illegible]
	(29.6)	S.D	0.016	0.013	0.012	0.006	0.002	[illegible]
		S.E.	0.005	0.004	0.004	0.002	0.001	[illegible]
12	31.6–35.5	Mean	0.193	0.080	0.016	0.055	0.012	[illegible]
	(33.5)	S.D.	0.020	0.018	0.007	0.010	0.002	[illegible]
		S.E.	0.006	0.005	0.002	0.003	0.001	[illegible]
13	35.6–39.	Mean	0.215	0.102	0.024	0.055	0.015	[illegible]
	(36.9)	S.D.	0.032	0.020	0.015	0.013	0.003	[illegible]
		S.E.	0.009	0.006	0.004	0.004	0.001	[illegible]

The same babies were also grouped on gestation age as follows group I 15 to 27.5 weeks, group II 27.8 to 31.5 weeks, group III 31.6 to 35.5 weeks, group IV 35.6 to 39.5 weeks, group V 39.6 to 43 weeks. While these groups are roughly comparable, the actual cases comprising the groups based upon the different criteria are not the same. The children fall into different groups under different criteria, hence the need for the double grouping.

The weighed portions of the tracings having been converted into areas could then be, based upon the 5µ section thickness, converted to volumes of tissue. As the number of nuclei counted in this area was available, the number of cells counted per cu mm could be roughly estimated. It was appreciated that inaccuracies, due to the varying size of the cells counted, of necessity occur (14) and thus, the estimate of megakaryocytes must be greatly in excess of reality. In view of the use of an identical method throughout the whole survey and the apparent consistent relative size of the cells, it did not appear to be justified to do differential cell size measurements and make the required corrections.

When the absolute cell counts had been estimated, the standard deviation of the estimates in each group was made and the standard error of the mean worked out, using the formula $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$. Statistical analysis between groups was worked out using probability tests (15).

Results

The total amount of tissue measured in the complete cross-section of ribs from 56 infants, together with the amounts of different types of tissue in the stillborn series, are shown related to crown rump length in table I

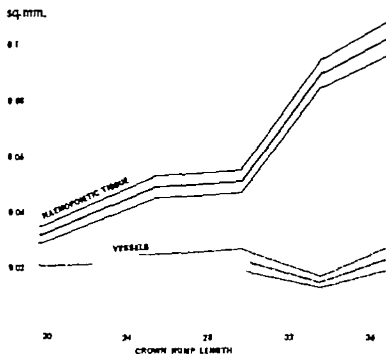


Fig. 1 The amount of space occupied by the haemopoietic tissue and by the blood vessels in comparable cross section of ribs from children dying during the last three months of intrauterine life.

The total amount of tissue surveyed increased progressively with the gestation age of the children and the crown rump length and, when the groups, both gestational and crown rump are analysed, there is a statistically significant increase ($P > 0.001$) between each successive alternate group with the single exception of the last group immediately prior to full term. The period of greatest increase is between groups 3 and 4 (35 to 37 weeks gestation, 30 to 33.5 cm crown rump length) where there is a significant increase ($P = 0.001$) between successive groups.

The different tissues do not all increase in amount equally The «periosteum» remains constant and so does the size of the blood vessels. The latter can best be seen in figure I While there is a steady increase in the volume of the haemopoetic tissue, there is a great relative diminution in the vascular space.

The total number of cells and counts in the children stillborn and living less than 5 hours is given in table II and the means of

Table II

Total cells and different cell types of marrow haemopoietic tissue (in thousands per cu mm)

No. of cases	C. R. length in cm range and mean.		Total	Mono-cytes	Lympho-cytes	Myeloid: Myelo-cytes	Myeloid: Neutro-phils.	Myeloid: Eosin-ophils	Megalo-cytes	[illegible]
10	14 –22.5	Mean	1044	177	21	368	99	13	14	[illegible]
	(19.4)	S.D.	259	153	48	170	78	17	15	[illegible]
		S.E.	82	48	15	54	25	5	5	[illegible]
10	22.6–27.5	Mean	1995	267	127	745	96	34	23	[illegible]
	(25.5)	S.D.	484	229	87	362	77	27	36	[illegible]
		S.E.	153	72	28	114	24	9	11	[illegible]
10	27.6–31.5	Mean	1735	190	110	523	132	62	28	[illegible]
	(29 6)	S.D.	304	117	124	175	85	54	37	[illegible]
		S.E.	96	37	39	55	27	17	12	[illegible]
12	31.6–33.5	Mean	1960	87	136	686	126	110	42	[illegible]
	(33.5)	S.D	508	50	132	248	57	63	33	[illegible]
		S.E.	147	14	38	72	16	18	10	[illegible]
13	33.6–39	Mean	1683	80	112	631	129	83	35	[illegible]
	(36.9)	S.D	411	28	92	283	60	38	29	[illegible]
		S.E.	114	8	26	78	17	11	8	[illegible]

Table III

Differential cell counts in the haemopoietic marrow tissue grouped on crown rump length.

of s	C. R. length in cm range and mean.		Mono-cytes	Lympho-cytes	Myeloid: Myelo-cytes	Myeloid: Neutro-phils	Myeloid: Eosin-ophils	Megalo-cytes	Ery… Norm.
	14 –22.5	Mean	18.8	1.9	34.6	9 0	1 4	1 1	20.8
	(19.4)	Range	0–50	0–5.8	20.8–52.6	2.9–17.6	0–3.5	0–3.1	4.3–41
	22.6–27.5	Mean	13.3	5.6	38.4	4.7	1.9	1.0	19.3
	(25.5)	Range	0–31	3.3–44	11–42.1	0–26.8	0–5.8	0–4	5 8–37
	27.6–31.5	Mean	11.5	6.1	29.5	8.1	4.1	1.4	22.4
	(29.6)	Range	1 1–21.9	0–20.2	15.6–50	2.2–1..9	0–12.5	0–5.1	10.6–38 9
	31.6–35.5	Mean	4 4	6.6	36.0	7.5	6.0	2.2	20.6
	(33.5)	Range	0–8.2	0–15.3	22.2–50.5	1.2–55	2.2 11.8	0–5.3	7.3–41.5
	35.6–39	Mean	4.9	6.2	37.3	7.6	5 4	2.0	20.3
	(36.9)	Range	1–9.2	0–18.4	26.4–50.5	1 1 11 1	1.1 10.6	0–5	8–52

these groups are presented in figure II and related to gestation age in figure III

There is a statistical significant increase (P = 0 001) in the total cellularity of the marrow between foetuses of crown rump length of 20 cm and those of 26 cm, corresponding to between 25 and 30 weeks gestation. While during this period, there appeared to be an increase in all of the cell types, the only groups showing a statistically significant increase (of over 0 001) were the lymphocytes. The

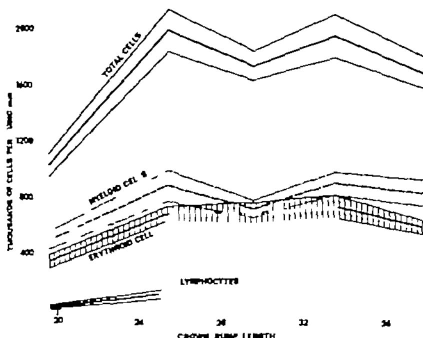


Fig 2. The concentration of cells found in the haemopoietic tissue of the rib marrow in stillborns dying during the last three months of intrauterine life.

increase in granulocytes was only significant at P = 0 01 and the combined normoblasts and macronormoblasts at the same level.

From this period onwards i. e. after 26 cm crown rump length and 30 weeks gestation, there was no significant change in the total number of cells or in the number of granulocytes or red cell precursors. The only individual cells otherwise showing a progressive increase throughout this period were the eosinophils, which showed a significant rise (P = 0 001) between 20 cm and 33.5 cm (25 weeks and 37 weeks gestation)

When the figures are looked at from a proportional viewpoint, there is little change throughout the whole of this period in the differential cell counts (table III) The granulocytes in the period of approximately 26 weeks maturity were 45 / and rose to 50 / at term. The nucleated red cell series commenced at approximately 35 / and at term were less than 40 / (fig 3)

The lymphocytes were approximately 2 / at 20 cm crown rump length (26 weeks gestational age) but at 26 cm crown rump

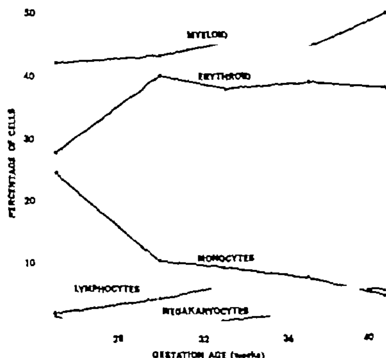


Fig 3. The proportion of the different types of cells found in the haemopoietic tissue of marrow sections from children dying during the last three months of intrauterine life.

length (30 weeks gestational age) they were approximately 8 / and remained at this level throughout the rest of the period studied. In the youngest age group we estimated monocytes at 18 / but these cells were at that time, indistinguishable from connective tissue cells and the apparent progressive fall in the proportion of these cells is probably artifactual.

Discussion

The study of human tissues from the age groups that we have attempted here is almost overwhelmed by possible errors. Until relatively recently cerebral birth trauma, antepartum haemorrhage and neonatal inhalation were accepted as accidental deaths and the chemist and the anatomist were content to accept the tissue from the majority of stillborn and neonate deaths as being essentially normal. The new change in approach can be seen in the amount of

selection that we had to make to obtain normal tissue in this age group.

From over 1000 necropsies on stillborns, we were able to select only 56 in which there was no obvious possibility of the child having been in a state of nutritional insufficiency prior to birth or death. The majority of so-called 'prems' had to be eliminated, most of these infants being small and wasted due to prolonged intrauterine undernutrition. The second error is that of maturity based on the mother's menstrual history and obstetric findings. The errors here are as great as that of the weight of the child which can be raised or lowered by retention of water or the elimination of meconium. Thus, we have largely used the crown rump length as the most reproducable and reliable measurement of a newborn child and, in particular one that we are able to make ourselves.

Our findings suggest that the growth of the different elements of the rib continues in a uniform pattern during the last three months of intrauterine life. The actual rate of growth may not be uniform and our figures suggest that there is a period of accelerated growth during the time when the child is between 30 and 34 cm crown rump length, which corresponds approximately to the 33rd and 37th gestational week. This corresponds to the time when the placenta is believed to be at the height of it s efficiency (16)

One feature that was a little surprising in our results was the lack of increase in the marrow blood vessels when compared to the increase in the actual haemopoetic tissue. A comparable change has been noted by many to occur in the earlier months of gestation (1 3 17 18 19) and what we have seen is a continuation of this change into the later part of pregnancy

The next point that arises from our results is the inconsistency between the number of cells that we find in the bone marrow which is in the region of 2000000 cells/cu mm and the counts obtained by workers such as GAIRDNER *et al.* (20) who attempted to estimate the activity of the bone marrow of the newborn child by doing absolute cell counts on marrow aspirates. It would be remar kable if our figures were comparable, owing to the variable diluting effect of the circulating marrow blood on marrow aspirates. Our counts were done on the haemopoietic tissue in the bone, with the complete exclusion of the circulating blood.

The method that we have used does not directly give an absolutely correct differential estimate of the number of cells

present, for the reasons of cell size mentioned previously and in any case, it would probably be impossible to make a correct assessment of the degree of shrinkage that occurred in individual sections as a consequence upon fixation and processing. A further factor is that noted by CALLEN AND LIMARZI (21) who, working on the blood and bone marrow in renal disease, found a higher concentration of cells in the post mortem marrow than was suggested by their studies of aspiration marrow. They explained an increased post mortem cellularity on a terminal diminution in the rate of discharge of cells while in the agonal state.

Direct observation of the cells in the marrow sections suggests that the concentration of nuclei in the tissues surrounding blood vessels is more than a quarter that of the concentration of red cell seen in the local blood vessels. If the concentration of the latter is in the region of 5000000/cu mm, this would suggest a marrow cell cellularity of well over 1000000 cells. Thus, we feel that the counts we have obtained are probably much more realistic than those obtained by workers using marrow aspiration.

Our findings suggest that until the 30th gestational week, the marrow tissue is not fully haemopoietic but that from this point onwards, the marrow is at full foetal cellularity which remains roughly constant throughout the last ten weeks of intrauterine life.

We have found no great change in the proportion of cells during this later third of intrauterine growth. The period that we have studied is a little later than that which interested YOFFEY AND THOMAS (18). They found that during the 10th to 14 th week of gestation foci of lymphocytes were scattered in the marrow tissue and they suggest that the lymph cells are the primary haemopoietic cells. In our own material, there appears a progressive increase in the number of lymphocytes throughout the whole period studied. We did not find any lymph follicles and must assume with YOFFEY AND THOMAS (18) that the lymphocytes have infiltrated into the marrow from the circulating blood.

Summary

Quantitative histological studies were carried out on the marrow of the ribs from 56 stillborn and newborn children. There is a progressive increase in the quantity of marrow haemopoietic tissue throughout the last three months of intrauterine life, but no comparable increase in the marrow blood sinuses. Quantitative assessments of the cells in sections suggest that the marrow tissue reached full cellular activity by the 30th gesta-

terine week and that no increased cellularity occurs or significant change in myelo-erythroid ratio occurs from this time until full term.

Zusammenfassung

Bei 56 Neugeborenen und Totgeburten wurde das Knochenmark der Rippen quantitativ histologisch untersucht. Es fand sich eine progressive Zunahme des hämopoetischen Gewebes während der letzten drei Monate des intrauterinen Lebens, jedoch zeigten die Blutsinus des Markes keine entsprechende Vermehrung. Quantitative Schätzungen anhand der Schnitte ergaben, dass das Markgewebe seine volle Zellaktivität um die 30. intrauterine Woche erlangt und daß bis zum Termin keine weitere Zunahme des Zellgehaltes und keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von Granulo- und Erythropoese mehr erfolgen.

Résumé

Des études histologiques quantitatives de la moelle osseuse des côtes ont été faites chez 56 nouveau-nés et enfants mort-nés. Nous avons pu constater une augmentation progressive des tissus hémopoïétiques durant les 3 derniers mois de la vie intra-utérine. Les sinusoïdes de la moelle ne présentent cependant pas une augmentation analogue. Des estimations quantitatives des cellules faites sur des coupes suggèrent que le tissu de la moelle atteint sa pleine activité cellulaire qu à la trentième semaine intra-utérine et qu'à partir de ce moment, il n'y plus, jusqu'à la naissance à terme, d'augmentation du contenu en cellules, ni de changement du nombre relatif des cellules de la granulo- et de l'érythropoïèse.

References

1. Sabin, F. R. Bone Marrow. – Physiol. Rev. 8. 191 (1928).
2. Wintrobe, M. M. and Shumacker, H. B. Comparison of hematopoiesis in the fetus and during recovery from pernicious anemia, together with consideration of the relationship of fetal hematopoiesis to macrocytic anemia of pregnancy and anemia in infants. J. clin. Invest. 14 837 (1935).
3. Yoffey, J. H. Thomas, D. B. and Russell, P. M. Studies in foetal blood-formation. II. Observations on the bone marrow. J. Anat. 94 376 (1960).
4. Koumkoumeli-Kostomichalou, P. Further Considerations in the Study of Human Embryo Haemopoiesis. Thesis Univ. Athens (19-9).
5. Shapiro, L. M. and Bassen, F. M. Sternal marrow changes during the first week of life. Correlation with peripheral blood findings. Amer. J. med. Sci. 202: 341 (1941).
6. Tecilazic, F. Ricerche ematologiche in vivo sul midollo osseo nella prima infanzia. Il midollo osseo nel neonato a termine e nel prematuro. Pediatria 43. 658 (1935).
7. Custer, R. P.: Studies on the structure and function of bone marrow. I. Variability of the haemopoietic pattern and consideration of method for examination. J. Lab. clin. Med. 17 951 (1932).
8. Yoffey, J. M. The mobilization and turnover times of cell populations in blood and blood-forming tissue. J. Histochem. Cytochem. 4 516 (1956).
9. Follis, R. H.: Studies on the chemical differentiation of developing cartilage and bone. I. General method alkaline phosphatase activity. Bull. Johns Hopk. Hosp. 85: 360 (1949).
10. Follis, R. H. and Berthrong, M. Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. Bull. Johns Hopk. Hosp. 85. 281 (1949).

11. Moss, M. L. Noback, C. R. and Robertson, G. G Critical developmental horizons in human foetal long bones. Correlated quantitative and histological criteria. Amer J Anat. 97 155 (1955).
12. Wright H. W Asling, C. W Dougherty H. L. Nelson, M. M. and Evans, H. M. Prenatal development of the skeleton in Long-Evans rats. Anat. Rec. 130: 659 (1958).
13. Kalpaktsoglou, P K. The Development of Haemopoiesis in Foetuses, Newborns and Young Infants. Athens Graphic Art. J Makris (1960).
14 Eränkö, O. and Kirkeby, J Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry (Karger Basel/New York 1955)
15. Fisher, R. A. Statistical Methods for Research Workers, 6th ed. (Oliver & Boyd, Edinburgh/London 1956).
16. Flexner, L. B. Cowie, D. B.; Hellman, L. M. Wilde, W S. and Vosburgh: The permeability of the human placenta to sodium in normal and abnormal pregnancies and the supply of sodium to the human fetus as determined with radioactive sodium. Amer J Obstet. Gynec. 55 469 (1948).
17 Johnstone, E. M. Changes in the morphology and function of the bone marrow after splenectomy Arch. Surg. 5 159 (1922).
18. Yoffey J M. and Thomas, D. B. The development of bone marrow in the human foetus. J Anat. 95 613 (1961)
19. Hoover, J. W ; Ackerman, G. A. and Knouff R. A. Vasculogenesis and erythropoiesis in the living yolk sac of the chick embryo. Anat. Rec. 140: 29 (1961)
20. Gairdner, D. Marks, J and Roscoe, J. D : Blood formation in infancy Part II Normal erythropoiesis. Arch. Dis. Child. 27 214 (1952)
21 Callen, J R. and Limarzi, L. R. Blood and bone marrow studies in renal disease. Amer J clin. Path. 20: 3 (1950).

Authors' address: Dr J L. Emery Children's Hospital, Sheffield 10 (England) and Dr. Pano K. Kalpaktsoglou, University Maternity Hospital, 'Alexandra', Athens (Greece).

Acta haemat. 34: 239–249 (1965)

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg)

Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten

Von H. E. Müller und F. Gramlich

Der menschliche Erythrocyt ist wohl der am besten untersuchte Zelltyp, bei dem unsere Kenntnisse vom molekularen Aufbau seines Stromas und Cytoplasmas, seiner Enzymausstattung, Energiebilanz und Lebensdauer, seiner physiologischen und pathologischen Funktionen am weitesten fortgeschritten sind. Im Rahmen dieser vielfältigen Untersuchungen untersuchten wir die Adsorption von Plasmaproteinen an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten und konnten dabei zeigen, daß sich die quantitative Zusammensetzung dieses Plasmaproteinfilmes deutlich von der Zusammensetzung der Proteine im Plasma unterscheidet. Darüber hinaus konnten Aussagen über die Menge der an Erythrocyten adsorbierten Proteine gemacht werden.

Das Problem des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche von Erythrocyten wurde erneut 1940 von Furchgott (1, 2) aufgegriffen. Er brachte damals die Formbeständigkeit der Erythrocyten mit einem Albuminfilm in Zusammenhang. Später glaubte man diese Vorstellungen durch Kataphorese-Versuche bestätigen zu können (3, 4, 5, 6). Andere Autoren bezweifelten indes die Existenz eines speziellen, formgebenden Faktors (4, 7, 8).

Die vorliegende Publikation soll alle von uns bisher zu diesem Thema vorgelegten Arbeiten (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) zusammen mit einem wesentlich erweiterten Versuchsmaterial kritisch sichten und neu auswerten. Dabei wird an Stelle der Größe P_G in früheren Veröffentlichungen ein Extrapolationswert angegeben, dessen Deutung klarer und übersichtlicher erscheint. Er erlaubt zudem quantitative Aussagen über die Menge der an Erythrocyten adsor-

bierten Proteine unter den Verhältnissen des normalen Blutes im Gegensatz zum P_G-Wert, der nur unter den speziellen experimentellen Bedingungen Gültigkeit besaß.

Das Untersuchungsschema bestand, wie schon ausführlich erörtert wurde (10 12, 14) in einer Isotopenverdünnungsanalyse. Die Auswertung geschah nunmehr durch Extrapolation der Verdünnungskurven auf Normalverhältnisse. Zum Vergleich sind neben den so erhaltenen Extrapolationswerten auch die alten P_G-Werte angegeben (Tab I)

Material

Human-Albumin wurde teils vom Radiochemical Centre, Amersham, als ^{131}Jod-markiertes Human-Albumin bezogen, teils wurde Human-Albumin ercinat der Behring-Werke Marburg, mit ^{131}Jod markiert. Alle übrigen Human-Proteine (Fibrinogen, γ-Globulin ercinat Sedimentationskonstante 7 α_1-saures Glykoprotein, α_2-Makroglobulin, tryptophanreiches Präalbumin und Transferrin) wurden ausschließlich von den Behring Werken, Marburg, bezogen und mit ^{131}Jod, bezogen vom Radiochemical Centre Amersham, markiert nach einer modifizierten Methode von Pressman und Sternberger (16) oder nach der Jet Methode von McFarlane (17).

Die Entfernung des nicht an Protein gebundenen Jods erfolgte teils durch Dialyse, teils durch Perkolieren an Säulen von Sephadex G 25 bzw Amberlite IR 45.

Der Gehalt an freiem Jod lag zwischen 0,2 und 8% (bei α_1-saurem Glykoprotein). Der Nachweis erfolgte durch Trichloressigsäure-Fällung der markierten Proteine und Bestimmung der Aktivität im Überstand. Bei dieser Methode wird einerseits proteingebundenes Jod abgespalten, andrerseits freies Jod adsorptiv an das denaturierte Protein gebunden. Die beiden Effekte bedingen gegenläufige Tendenz und belegen die erhaltenen Werte mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor

Wie eine Versuchsserie zeigte, lagen bei Mengen von <10% ungebundenem, freiem Jod die erhaltenen Werte (P_g-Werte ebenso wie Extrapolationswerte) im statistischen Streubereich der Methode.

Die spezifische Aktivität der markierten Proteine lag bei allen Versuchen zwischen 2 und 10 µCi/mg.

Aussagen über die Nativität der ^{131}Jod-markierten Proteine lassen sich nur mit Einschränkungen machen. Die elektrophoretische und immunoelektrophoretische Prüfung ergab keine Hinweise auf eine Denaturierung. Wie eigene Vorversuche zeigen, ist jedoch die Methode der Adsorption von Proteinen an Grenzflächen selbst ein guter Hinweis für die Nativität der Proteine. Dabei erhöht oder verringert sich bei stärkeren Denaturierungen die Adsorptionsfähigkeit der Proteine um den Faktor > 2 in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (18) In Zusammenhang damit stehen Untersuchungen von McFarlane *et al.* (19) der bei seiner von uns übernommenen Jodierungsmethode (17) keine Verkürzung der Überlebenszeit von markierten Proteinen beobachtete, was für eine sehr weitgehende Nativität der Proteine sprechen dürfte. Auf Grund dieser Untersuchungen von McFarlane, der engen Anlehnung an die von ihm beschriebene Jodierungsmethode und die indirekten Hinweise aus dem Adsorptionsverhalten der Proteine selbst läßt sich zumindest eine grobe, nachweisbare Denaturierung weitgehend ausschließen.

Methode

Das Blut gesunder Versuchspersonen wurde auf Oxalat abgenommen, je 3,2 mg Kaliumoxalat und 4,8 mg Ammoniumoxalat zu je 5 ml Blut. Die Proben wurden zentrifugiert und die »buffy-coats« entfernt, um etwaige Effekte der Leukocyten und Lymphocyten möglichst zu verringern.

Zu je 5 ml so vorbehandelten Blutes wurden etwa 0,5–5 mg eines markierten Proteins zugesetzt, das Impulszahlen zwischen 3,5 und 20 · 10^{4} Imp./min bei der gegebenen Versuchsanordnung aufwies. Bei Impulsangeboten unter 3 · 10^{4} Imp./min blieben die erhaltenen Werte unabhängig von der zugesetzten Aktivität.

Das vorbehandelte Blut wurde 30–120 min zur Gleichgewichtseinstellung zwischen gelösten und adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Proteinmolekülen mit dem aktiven Protein inkubiert. Die *Inkubationszeit von 30–120 min garantiert dabei*, wie eigene* und fremde Untersuchungen zeigten (20, 21) eine quantitativ vollständige Einstellung des Adsorptions-Desorptions-Gleichgewichtes. Danach wurde mit 5 ml Sörensen-Phosphatpufferlösung, p_H 7,2 gut durchmischt, 3 min bei 1200 g zentrifugiert und vom Überstand jeweils wieder 5 ml abpipettiert. Nach Zugabe von wiederum 5 ml Phosphatpufferlösung wurde die Erythrocytensuspension wieder gründlich durchmischt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde elfmal durchgeführt und in den so erhaltenen Waschüberständen die Aktivität des ^{131}Jod-Proteins mit einem Scintillationszähler mit Bohrlochkristall der Firma Frieseke & Höpfner, Erlangen, gemessen. Die Koinzidenz wurde durch Verdünnung der Lösungen berücksichtigt. Nach beendigter elfter Waschung wurde die Aktivität des Erythrocytensediments bestimmt. Aus den Aktivitätsmessungen der einzelnen Waschüberstände und der zuletzt am Erythrocytensediment gefundenen Aktivität läßt sich die Aktivität des Erythrocytensediments nach jeder einzelnen Waschung berechnen.

Ergebnisse

Trägt man die Aktivität des Erythrocytensediments in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschvorgänge auf, dann erhält man die Kurven der Abb. 1 wobei die vorgegebene Gesamtaktivität zu 100 / angegeben ist. Die Aktivitäten fallen während der ersten Waschungen sehr rasch ab um dann für die einzelnen Proteine spezifische, etwa *gleichbleibende* Beladungswerte anzunehmen. Das Verhalten der Kurve läßt sich zwanglos mit der Annahme deuten, daß dem starken Abfall zu Anfang ein Verdünnungseffekt zu Grunde liegt, der so lange bestimmend ist, wie die Protein-Mengen im Überstand groß und gegenüber den adsorptiv gebundenen Protein-Mengen. Bei den späteren Waschvorgängen dagegen ist dann das Milieu soweit an Protein verarmt, daß die adsorbierten Proteine stärker ins Gewicht fallen. Sie gehen entsprechend ihrem Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht zunehmend in Lösung in dem Maß wie das Außenmilieu an Protein verarmt und werden dann ausgewaschen. Damit erklärt sich der leicht abfallende Kurvenverlauf bei den letzten Waschvorgängen. Legt man diese

* unveröffentlicht.

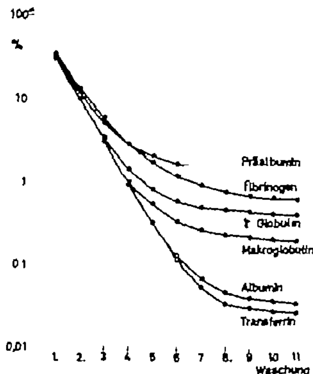


Abb. 1 Konzentrationsabnahme der Plasmaproteine an den Erythrocytenoberflächen während 11 Waschungen (Nr 5).

Neigung und das bei den letzten Waschungen erreichte Niveau als Maßstab für die Desorption während der einzelnen Waschvorgänge als erste Näherung zu Grunde (tatsächlich handelt es sich auf Grund der FREUNDLICHschen Adsorptionsisothermen nicht um Gerade) und extrapoliert man damit auf die nullte Waschung, also auf das ungewaschene Blut, dann erhält man, wie Abb. 2 zeigt, die in Tab. I angegebenen Extrapolationswerte als ein Maß für die Menge der Proteine, die adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebunden sind. Weil aber in Wirklichkeit die Adsorption der Proteine an der Erythrocytenoberfläche keine lineare Funktion ihrer Konzentration darstellt, sondern FREUNDLICHschen Adsorptionsisothermen folgt, repräsentieren die erhaltenen Extrapolationswerte nur Minimalwerte des tatsächlich vorhandenen Filmes. Es ergaben sich prinzipiell die gleichen Werte, wie bei den P_0-Werten vorhergehender Arbeiten, wenngleich die neue Auswertung die Differenzen bei der Adsorption verschiedener Proteine etwas mehr verwischt. Aber auch bei dieser Auswertung gelangt man zu dem

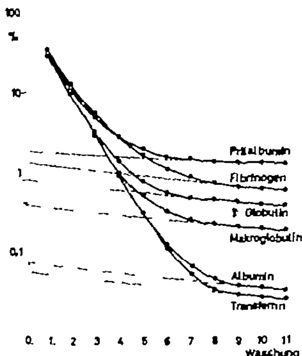


Abb. 2. Extrapolation der Kurven auf die Waschung 0 führt zu den Extrapolationswerten (EW) für Probe Nr. 3

Resultat, daß sich die einzelnen Proteine verschieden stark an die Zellmembran anlagern. In Tab. I sind alle Extrapolationswerte (EW) und auch die entsprechenden PG-Werte zusammengefaßt, bei denen die oben diskutierten Voraussetzungen (geringer freier Jodgehalt, hinreichend hohes Impulsangebot, keine nachweisbare Denaturierung) erfüllt sind. Extrapolationswerte und PG-Werte stimmen bei Albumin, γ-Globulin und α_2-Makroglobulin gut überein, bei Fibrinogen und Präalbumin sind die Extrapolationswerte kleiner und bei α_1-saurem Glykoprotein und Transferrin sind die Extrapolationswerte größer als die entsprechenden PG-Werte. Es läßt sich also bei den Extrapolationswerten gegenüber den PG-Werten eine Nivellierung feststellen, bei der sich die Extremwerte (Präalbumin und Transferrin) näher kommen.

Die in Tab. II für die Extrapolationswerte aus Tab. I errechnete statistische Streubreite (quadr. Mittel) ist beträchtlich, jedoch

Tabelle 1

Extrapolations- und P_O-Werte zur Berechnung der Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten.

Nr	Albumin		Fibrinogen		gamma-Globulin		alpha-saures Glykoprotein		alpha-Makroglobulin		Präalbumin		Transferrin	
	EW	P_O	EW	P_O	EW	P_O	EW	P_O	EW	P_O	EW	P_O	EW	P_O
1	0,13	0,058	0,80	1 46	0,82	1,33	—	—	0,28	0,39	1 10	2,36	0,105	0,055
2	0 138	0,062	0,89	2,02	0,73	1 45	—	—	0,36	0,60	1 42	3,35	0,074	0,043
3	0,076	0,077	1 10	2,75	0,77	0,97	—	—	0,38	0 49	1 75	3,76	0,054	0,047
4	0,138	0,053	0,71	1,24	1 07	2,12	—	—	0,97	1 75	4 17	10,16	0,194	0,180
5	0,049	0,036	0,18	0,22	0,36	0,43	—	—	0,28	0,48	1,23	1 63	0,10	0,122
6	0,245	0,103	0,68	0,66	0,28	0,39	—	—	0,23	0,23	—	—	0,41	0,600
7	0,22	0,130	0,37	0,43	1 41	1,99	—	—	0,22	0,26	—	—	0,076	0,089
8	0,042	0,044	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	0,040	0,032	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	0,277	0,403	0,45	0,180	0,081	0,089	—	—	0,15	0,164	0,35	0,83	0 059	0,058
11	0,214	0,30	0,096	0,172	0,11	0,115	—	—	0,08	0,088	0,55	0 75	0,068	0,070
12	0,35	0,277	0 17	0,191	0,17	0,060	—	—	0,20	0,229	0,43	0,74	0,30	0,037
13	0,26	0,34	0,13	0,151	0,11	0,147	—	—	0,21	0,18	0,43	0,48	0,076	0,082
14	0,281	0,308	0,16	0,160	0,095	0,038	—	—	0,12	0,066	0,52	0,97	0,021	0,023
15	0,34	0,378	0,22	0,210	0,25	0,083	—	—	0,19	0,072	0,63	1,31	0,100	0,075
16	0,35	0,396	0,19	0,208	0,57	0,214	—	—	0,12	0,082	1,59	2,37	0,096	0,098
17	0,51	0,969	0,19	0,295	0,15	0,164	—	—	0,24	0,230	0,84	1 45	0,193	0,151
18	—	—	—	—	0 046	0,041	—	—	0,21	0,167	0,26	0,20	0 11	0 043
19	—	—	—	—	0,29	0,054	—	—	0,27	0 135	0,25	0,297	0,20	0,036
20	—	—	—	—	0,06	0,043	—	—	0,20	0,156	0,26	0 170	0,078	0 044
21	—	—	—	—	0,063	0,032	—	—	0,23	0,216	0,23	0,21	0,12	0,037
22	—	—	—	—	0,30	0,157	—	—	0,83	0,708	0,37	0 432	0,34	0,043
23	0 13	0,034	—	—	0,14	0,067	0,58	0,100	—	—	2,6	0 039	0,17	0,012
24	—	—	—	—	0,17	0,064	0,27	0,030	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	0,30	0,279	0 12	0,013	—	—	1,38	0 059	0,98	0,020
26	0,28	0,019	—	—	0, 4	0,061	0,24	0,019	—	—	1 15	0 080	0 49	0,015
27	0,30	0,050	—	—	0,20	0,20	0,79	0 178	—	—	0,82	0,080	0,34	0,019

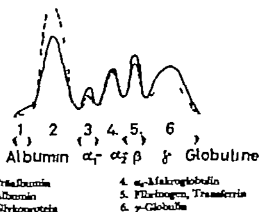
Tabelle II

Zusammenfassendes Ergebnis der Untersuchungen und Berechnungen zur Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten.

Protein	P am Plasma (%)	am Erythr. (%)	Adsorption am Erythr. (EW in %)	Streuung	Zahl der Moleküle pro Einzelerythrocyt	Anreicherungsfaktor
Albumin	57,5	48,9	0,219	± 0 123	110000	0,85
Fibrinogen	5,1	5,1	0,42	± 0,52	2800	1,65
γ-Globulin (7S)	18,1	23,9	0,35	± 0,34	20000	1,32
α_1-saures						
Glykoprotein	0,7	1 1	0 40	± 0,28	4000	1,57
α_2-Makroglobulin	2,8	3,2	0,29	± 0,22	800	1 14
Präalbumin	0,25	0,96	0,94	± 0,66	4000	3,84
Transferrin	4,9	4,1	0,22	± 0,23	7000	0,84

ergeben sich zumindest für die oben erwähnten Extremwerte deutlich unterscheidbare Adsorptionswerte.

Auf eine Einrechnung der individuellen Blutwerte (Hämatokrit, Erythrozytenzahl und Gesamtproteingehalt im Plasma) wurde aus dem gleichen Grund verzichtet. Es kamen generell Normalwerte (Hämatokrit 40 %, Erythrozytenzahl 4 5 10^6/1 mm³ Gesamt proteingehalt 7g %) zur Berechnung weil die individuellen Streu werte klein sind gegenüber den methodisch bedingten Fehlern. In die angegebenen s-Werte gehen dabei alle diese Faktoren gemein sam ein. Den in Tab. II angegebenen Plasmaproteinwerten liegen



1 Präalbumin
2. Albumin
3. Glykoprotein
4. α_2-Makroglobulin
5. Fibrinogen, Transferrin
6. γ-Globulin

Abb 3. Normales Elektrophoresediagramm von Plasma (gestrichelter Kurvenzug) und hypothetisches Elektrophoresediagramm der adsorptiv in anderer Verteilung an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Plasmaproteine (ausgezogene Kurve)

immunologische Bestimmungen zugrunde, wodurch sich die relativ hohen Werte erklären (22, 23)

Die Abb 3 soll die Werte der Tab. II graphisch darstellen, wobei der gestrichelte Kurvenzug dem normalen Elektrophoresediagramm entspricht, während die ausgezogene Kurve das hypothetische Elektrophoresediagramm der adsorptiv gebundenen Proteine darstellen soll.

Diskussion

Die Ergebnisse legen dar daß der Erythrocytenoberfläche ein adsorptiv gebundener Plasmaproteinfilm anhaftet, dessen Zusammensetzung sich von der Zusammensetzung der im Plasma frei gelösten Proteine deutlich unterscheidet. Die veränderte Zusammensetzung des Plasmaproteinspektrums an der Erythrocytenoberfläche gründet sich auf die unterschiedliche Bindungsneigung, das heißt die spezifische Adsorptionsstärke der einzelnen Bluteiweißkörper zur Oberfläche der roten Blutkörperchen. Hiermit übereinstimmende Teilbefunde wurden kürzlich auch von Klein (24) Pirofsky *et al* (25) und Hughes-Jones *et al.* (90) mitgeteilt. Da das Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht der Proteine an der Erythrocytenoberfläche weitgehend auf Seiten der gelösten Anteile liegt, läßt sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur ein quantitativ kleiner Anteil des tatsächlichen unter Vollblutbedingungen vorhandenen Proteinfilmes an der Erythrocytenoberfläche erfassen. Der Flächenbedarf dieser adsorptiv an der Erythrocytenoberfläche gebundenen Moleküle ist selbst unter der Voraussetzung einer monomolekularen Schicht sehr gering Mindestens 5–10 / der gesamten Oberfläche werden von dem beschriebenen Proteinfilm bedeckt.

Aussagen über die funktionelle Bedeutung dieses Proteinfilmes an der Erythrocytenoberfläche sind spekulativer Art Einmal läßt sich vermuten daß der Zellstoffwechsel über die Adsorption spezifisch wirksamer Makromoleküle gesteuert werden kann, wie das bei der Pinocytose einzelner Zelltypen oder bei der Mitose von Leukocyten durch Phytagglutinein oder andere immunologisch wirksame Substanzen beobachtet wurde (26, 27) Zum andern läßt sich auch ein unspezifischer Effekt gleicher Art in Erwägung ziehen, wie er ebenfalls schon beschrieben wurde (28 29)

Ob die an der Oberfläche besonders angereicherten γ-Globu line bezüglich immunologischer Reaktionen etwa als sessile Anti körper eine besondere Funktion zu erfüllen haben, muß offe bleiben.

Weiter wurde diskutiert, daß die Erythrocyten mit ihre großen Gesamtoberfläche und ihrem Proteinfilm pathologisch Plasmaproteine auf Grund ihrer Antigenität oder ihrer Denatu rierung selektiv durch Adsorption binden und dann aus den Organismus eliminieren (30 31) Zwar konnte unter pathologischer Bedingungen eine signifikant veränderte Adsorption verschiedene Proteine an die Erythrocytenoberfläche nachgewiesen werden (14) doch bleiben die Ursachen, die diesem Phänomen zugrunde liegen offen.

Zusammenfassung

Auf der Erythrocytenoberfläche befindet sich ein adsorptiv gebundener Plasma proteinfilm. Seine Zusammensetzung zeigt gegenüber der Zusammensetzung der im Plasma frei gelösten Proteine Verschiebungen.

Summary

A plasma protein film is adsorbed at the erythrocyte surface. The composition o this plasma protein film is different from that of the soluble plasma proteins.

Résumé

Un film de protéines plasmatiques est adsorbé à la surface des érythrocytes. Sa composition est différente de celle des protéines plasmatiques en solution.

Literatur

1. Furchgott R. F Disk-sphere transformation in mammalian red cells. J exp. Biol 17 30 (1940).
2. Furchgott R. F and Ponder, E. Disk-sphere transformation in mammalian rec cells. The nature of the anisospheric factor J exp. Biol. 17 117 (1940).
3. Harris, E. J Transport and accumulation in biological systems (Butterworth, London 1960).
4. Prankerd, T A. J The Red Cell (Blackwell, Oxford 1961).
5. Pfeil, W und Ruhenstroth-Bauer, G. Untersuchungen über die Proteinadsorption an menschlichen Erythrocyten. Klin. Wschr 34 11 (1956).
6. Ruhenstroth-Bauer, G. und Sachtleben, P in Bauer: Medizinische Grundlagenforschung, Bd. II S. 637 (Thieme, Stuttgart 1959)
7 Brown, E. A. The adsorption of serum-albumin by human erythrocytes J cell. comp. Physiol. 47 167 (1956).

8. Bessis, M. et Bricka, M. Études au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Rev. Hémat.* *5*: 396 (1950)
9. Müller, H. E. und Gramlich, F. Untersuchungen am natürlichen Serumproteinfilm der Erythrocytenoberfläche. Acta haemat. *29*: 135 (1963).
10. Müller, H. E. und Gramlich, F. Die normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *334*: 103 (1963)
11. Müller, H. E. und Gramlich, F. Ergänzende Untersuchungen zum Plasmaproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrocyten. Naturwissenschaften *50*: 447 (1963).
12. Gramlich, F. und Müller, H. E.: Weitere Untersuchungen zum Serumproteinfilm an der Oberfläche normaler menschlicher Erythrocyten. Acta haemat. *30*: 236 (1963)
13. Müller, H. E. und Gramlich, F.: Die normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche von Kaninchenerythrocyten. Experientia (Basel) *19*: 571 (1963).
14. Müller, H. E. und Gramlich, F.: Die Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten bei verschiedenen Krankheitsbildern. Blut *10*: 135 (1964)
15. Müller, H. E. Die Zusammensetzung des *Plasmaproteinfilmes* an der Oberfläche von Erythrocyten. 2nd Int. *Congr. of Histo- and Cytochemistry* Frankfurt/Main, 1964 p. 134 (Springer Berlin / Göttingen / Heidelberg 1964).
16. Pressman, D. and Sternberger, L. A. The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity J. amer. chem. Soc. *72*: 2226 (1950)
17. McFarlane, A. S. Labelling of plasma proteins with radioactive iodine. Biochem. J. *62*: 135 (1956)
18. Müller, H. E. Über die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen in Abhängigkeit von ihrer Denaturierung. Inaug.-Diss., Mainz 1964
19. Cohen, S. Holloway R. C. Matthews, C. and McFarlane, A. S. Distribution and elimination of ^{131}I and ^{14}C-labelled plasma proteins in the rabbit. Biochem. J. *62*: 143 (1956)
20. Hughes-Jones, N. C. and Gardner, B. The exchange of ^{131}I-labelled proteins between red cells and serum. *Biochem. J.* *83*: 404 (1962).
21. Schubothe, H. Serologie und Klinik der autoimmunhämolytischen Erkrankungen. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde (Springer Berlin / Göttingen / Heidelberg 1959).
22. Schultze, H. E. und Schwick, G. Quantitative immunologische Bestimmung der Plasmaproteine. Behringwerk Mitteilungen *33*: 57 (1958).
23. Wuhrmann, F. und Märki, H. H. Dysproteinämien und Paraproteinämien (Schwabe, Basel / Stuttgart 1963)
24. Kleine, N. Über den Verlauf der Adsorptionsisotherme und der Desorption von Plasmaeiweiß bei gelagerten Erythrocyten. Ber. 9. Tag. Dtsch. Ges. Bluttransf., Braunschweig 1960. Bibl. haemat. *12*: 105 (1961).
25. Pirofsky, B. Cordova, M. and Imel, T. Non-immunologic reaction of globulin molecules with the erythrocyte surface. Vox Sang. *7*: 334 (1962).
26. Barkhan, P. and Ballas, A. Phytohaemagglutinin: Separation of haemagglutinating and mitogenic principles. Nature (London) *200*: 141 (1963).
27. Aspegren, N. and Rorsman, H. Mitosis stimulating effect of tuberculin on lymphocytes from peripheral blood. J. Allergy *35*: 433 (1964)

28. Koblet, H.; Diggelmann, H. und Jeunet, F. Zur Frage der unspezifischen Wirkung von γ-Globulin. Hemmung metabolischer Funktionen der isolierten perfundierten Rattenleber durch humanes Standard-γ-Globulin. Helvet. med. Acta 31/ 169 (1964).
29. Brambell, F. W. R.; Hemmings, W. A. and Morris, I. G. A theoretical model of γ-globulin catabolism. Nature (London) 203, 1352 (1964).
30. Dettmann, R. Abwehrfunktion der Erythrocyten. Schweiz. med. Wschr. 43, 1208 (1960).
31. Gramlich, F.: Die Bindungsfähigkeit roter Blutkörperchen. Ein Beitrag zur Pathogenese erworbener hämolytischer Zustände. Fol. haemat. N. F. 9, 15 (1964).

Adresse der Autoren: Dr. Dr. H. E. Müller und PD Dr. F. Gramlich, I. Med. Klinik und Poliklinik der Universität, Langenbeckstr. 1, 6500 *Mainz* (Deutschland)

gungen («toxische Granulation»). Die Bezeichnung «eosinophil» für die Neutrophilen des Menschen wird nicht verwendet, da sie den Blutzellen mit auffallenden groben eosinophilen Granula, eben den «Eosinophilen» vergeben wurde.

Bei vielen Säugern (z. B. Hasenarten, Kaninchen, Meerschweinchen, Elefanten und Affenarten) ist die eosinophile Grundsubstanz der Neutrophilen deutlich eosinophil granuliert. Diese Neutrophilen werden oft als «Pseudoeosinophile» bezeichnet, um sie von den daneben vorhandenen «echten» Eosinophilen zu unterscheiden. Bei gewissen Nichtsäugern können die Granula der «Pseudoeosinophilen» sehr grob und bedeutend größer als bei den Eosinophilen sein, z. B. beim Quastenflosser, dem Coelacanth Latimeria chalumnae. Oft ist die «pseudoeosinophile» Substanz der Neutrophilen, besonders bei primitiven Vertebraten auch kristallin spindel- nadelförmig und elliptisch geformt. In der Zoologie werden diese den Neutrophilen des Menschen entsprechenden homologen Blutzellen der Tiere oft als «Eosinophile Typ I» und die eigentlichen eosinophilen als «Eosinophile Typ II» bezeichnet. Die Situation wird noch verwirrter da bei manchen Tierarten, z. B. den Schlangen, die Neutrophilen stark azurophil und nicht «pseudoeosinophil» granuliert sind. Diese werden dann in der Zoologie als «Azurophile» bezeichnet. Wer kann sich da auskennen, welche Zellart eigentlich gemeint ist, wenn er ohne eigene Erfahrung auf die Literatur allein angewiesen ist? Bei manchen Tierarten schließlich fällt das färberische und histochemische Verhalten gewisser Blutzellarten vollständig aus dem Rahmen der sonst charakterisierenden Terminologie heraus. So sind beim Strandwolf (Hyaena brunnea) und dem Königsgeier (Gypagus papa) die Granula der Eosinophilen keineswegs eosinophil, sondern basophil («Pseudobasophile»), aber im Gegensatz zu denjenigen der echten Basophilen nicht metachromatisch, denn sie färben sich mit den üblichen blauen Farben ohne Farbumschlag rein blau. Ja, bei der Fleckenhyäne (Hyaena crocuta) färben sich die Granula weder eosinophil noch basophil, sie sind farblos, chromophob. (Dieses ist nebenbei ein Beispiel, daß ausgesprochene Sekundärunterschiede bis zu den Arten derselben Tiergattungen vorkommen können.) Auch histochemisch können tiefgreifende Unterschiede bei den Eosinophilen vorhanden sein: Beim Menschen, vielen Säugern und Nichtsäugern sind es die Eosinophilen, welche die intensivste Peroxydasereaktion geben. Sie sind aber obligat peroxydasenegativ bei vielen Nichtsäugern, angefangen beim Coelacanth, bei den Caudaten, z. B. Salamanders, Tritonen und höher hinauf, unter den Säugern bei den Procavia- Rhinoceros- Hyänen- und Katzenarten.

Die klassischen Bezeichnungen der drei segmentkernigen Leukozytenarten des Menschen, der Blutbasophilen, Eosinophilen und Neutrophilen (auch «Granulozyten» genannt, doch ist diese Bezeichnung ungenau, da auch die Monozyten, Lymphozyten, Blutplättchen der Säuger Thrombozyten der Nichtsäuger und die Gewebsbasophilen granuliert sind) sind nach ihrer Farbstoffaffinität geprägt worden. Wenn bei gewissen Tierarten die Farbstoffaffinität für dieselbe Zelle eine andere ist soll man sie nach ihrer spezifischen Anfärbbarkeit anders als beim Menschen bezeichnen, wie es heute in verschiedenen Publikationen getan wird? Wir sind der Meinung, daß ein solches Vorgehen nur ein großes Durcheinander ergeben muß und daß jedenfalls vorderhand, bis sich irgendeine annehmbare allgemeine Lösung findet, die klassischen bestbekannten Bezeichnungen von der humanen Hämatologie benutzt werden sollten, auch wenn im speziellen Fall die Farbstoffaffinität nicht dieselbe ist. Jedermann weiß, was gemeint ist, und man kann daneben in Klammern die aufgekommenen Synonyma setzen, z. B. Blut- und Gewebsbasophile (Mastzellen, Heparinozyten, Labrozyten), Eosinophile (Azidophile, Eosinophile Typ II) Neutrophile (Heterophile, Pseudoeosinophile, Eosinophile Typ I Azurophile)

Die von JORDAN vorgeschlagene Bezeichnung «heterophil» für die den Neutrophilen des Menschen entsprechenden Leukozytenarten der Tiere ist an sich nicht schlecht, doch könnte diese Bezeichnung ebenso gut für die echten Eosinophilen ge-

braucht werden, die bei gewissen Tieren nicht eosinophil, sondern pseudobasophil resp. chromophob reagieren, also ebenfalls «heterophil» sind.

Barrera befaßt sich in seiner Monographie mit den Granulocyten bei Mensch und Tier.

Im ersten Teil bespricht der Autor diese Leukocytenarten beim normalen Menschen und seinen erblich-konstitutionellen Anomalien. Von diesen kommen zur Sprache die Pelger Huët-Anomalie, die mittelstarke Segmentierung der Eosinophilenkerne, die Hochsegmentierung der Neutrophilenkerne, von welcher der Autor eine eigene Sippe beschreibt, die Anomalien von Alder Chediak-Steinbrinck, May Hegglin, Jordan's (dystrophyle) Vakuolisierung der Leukocyten bei der progressiven Muskeldystrophie Typ Erb und die monophyle Vakuolisierung der Lymphocyten bei der juvenilen amaurotischen Idiotie Tay-Sachs. Bei einer eigenen Sippe des Autors, die er zur Alder-Anomalie zählen möchte, sind die Träger im Gegensatz zum echten Alder aber nicht homozygot, sondern heterozygot, der Erbgang ist daher nicht rezessiv sondern dominant und nur die Neutrophilen zeigen eine anormale Granulation, die allerdings beim Typ Hottinger Eichenberger der Alder-Anomalie auch vorkommt. Bei einem Individuum, dessen beide Eltern heterozygote Anomalieträger sind, ist das Merkmal mit einem rezessiven Erbleiden, der Atrophia gyrata Fuchs des Augenhintergrundes kombiniert, die übrigens beim Alder nie beobachtet wurde. Handelt es sich nicht um eine Anomalie sui generis, bei welcher *wie bei der Lymphocytenvakuolisierung der juvenilen amaurotischen* Idiotie das grob somatische, scheinbar rezessiv vererbbare Zeichen homozygot, die nur im Mikroskop nachweisbaren harmlosen qualitativen Leukocytenveränderungen aber auch bei den Heterozygoten, dann als einziges Merkmalszeichen vorkommen? – Dieser Teil ist knapp und objektiv abgefaßt.

Der zweite, umfangreichere Teil befaßt sich mit den Granulocyten der Wirbeltiere. Es werden die Befunde wiedergegeben von 253 Blutuntersuchungen bei 164 Tierarten 9 Fischen, 24 Amphibien, 41 Reptilien, 35 Vögeln und 55 Säugern. Die modernsten zoologischen Nomenklaturen werden benutzt. Die Blutausstriche wurden nach Pappenheim, mit der Peroxydase nach Graham-Knoll und der Sudanschwarzmethode gefärbt und gelegentlich wurde das Phasenkontrastverfahren herangezogen. Auch dieser Teil ist sehr minutiös und fleißig verfaßt und ist eine Fundgrube für spätere Forscher auf diesem Gebiet. Auf eine Wiedergabe des ganzen Inhalts kann hier verzichtet werden. Es seien nur einige prinzipielle Objektionen gemacht, welche den Wert der Monographie nicht schmälern, Nachuntersucher aber behüten sollen, Fehldeutungen zu übernehmen, die nur zu unnützen Diskussionen führen und den Fortschritt hemmen könnten.

Barrera benutzt je nach dem tinktoriellen Verhalten für die Neutrophilen der verschiedenen Tierarten auch die Bezeichnung «Azurophile» oder «Eosinophile I» und dieses sehr inkonsequent. Er verwechselt bei den Crocodilia die Neutrophilen, die er «Eosinophile II» also echte Eosinophile bezeichnet, mit den letzteren, die er «Eosinophile I» also Neutrophile bezeichnet. Die entsprechenden Zellen der Maus und Ratte, die eindeutig neutrophil sind, werden als «Eosinophile I» bezeichnet, weil der Autor in ihnen glaubt pseudoeosinophile Granula zu finden. Umgekehrt bezeichnet er die Neutrophilen der Elefanten- und Affenarten, die soweit vom Referenten untersucht, alle pseudoeosinophile Granula enthalten, als «neutrophile» und nicht Eosinophile I, wie man es nach der von ihm verwendeten Nomenklatur erwartet hätte. Daß es tatsächlich keinen Sinn hat, an der Vielfalt der Bezeichnungen für ein und dieselbe Zelle den Neutrophilen festzuhalten, wird durch die Hilflosigkeit von Barrera noch unterstrichen.

In einem offenbaren Irrtum befindet sich der Autor wenn er die reifen runden Granulocytenkerne der Crocodilia, Testudinata und Serpentes als segmentiert, sogar hochsegmentiert ansieht! Er schreibt wörtlich (S. 86) «Opmerking: de door verschillende auteurs vooropgezette mening als zou de kern van de granulocyten bij talrijke reptielen een ronde of ovale vorm hebben is zeker onjuist. Met behulp van dezelfde hulpmiddelen die wij reeds bij het onderzoek der Amphibia vermeld hebben (fasen-

kontrast en kleurfilters) is gemakkelijk aan te tonen dat de kern samengesteld is uit verscheidene gesuperponeerde kernsegmenten.» Hier verwechselt BARRERA offensichtlich die Segmentierung mit der Fragmentierung der Kerne. Bei allen Blutkörperchen verdichten sich mit zunehmender Reife die Kerne. Die Struktur des Basichromatins wird gröber und es bilden sich in den rund bleibenden Kernen grobe Basichromatinschollen. Besonders ausgesprochen und, wie bekannt, geradezu charakteristisch ist diese grobe Schollenbildung der Kerne für die Pelger-Anomalie, die bei Mensch und Kaninchen vorkommt. Bei den reifen rundkernigen Granulozyten der Homozygoten zerfällt das Basichromatin in 8 bis 12 grobe Schollen, doch werden sie vom flüssigeren Oxychromatin kugelig, also rund, zusammengehalten. Mit dem Phasenkontrastverfahren hat STRAUB zeigen können, daß sie im Nativpräparat wohl noch die sog. «Kernbuchten» erkennen lassen, daß sie aber mit Bestimmtheit nicht segmentiert sind. *Diese intranukleären Schollen sind keine Segmente, sondern Fragmente.* Kerne sind erst dann segmentiert, wenn die Kugelform verloren geht und mit Fäden verbundene Teilstücke des Kernes sich im Protoplasma verteilen. Diesen Unterschied zwischen Fragmentierung und Segmentierung prägt man sich am einfachsten ein bei der Betrachtung der reifen bisegmentierten Granulozytenkerne der Heterozygoten dieser Anomalie: diese Kerne sind segmentiert, das Basichromatin der Segmente ist zudem fragmentiert. Was für die reifen runden Pelgerkerne zutrifft, trifft auch für die reifen runden Granulozytenkerne der angeführten Tierordnungen zu: diese Kerne sind rund und inwendig fragmentiert, aber nicht segmentiert. Es ist darum auch verständlich, wenn der Autor die durch alle Fakten bisher unterstützte Ansicht des Referenten ablehnt, daß die phylogenetische Entwicklung der Kernformen von den reifen runden über die eingebuchteten zu den segmentierten und schließlich hochsegmentierten geht, denn für BARRERA sind die runden Kerne segmentiert, teils sogar hochsegmentiert. Diese etwas auffallenden Schönheitsfehler, wenn man sie erkennt, vermindern nicht den Wert der Monographie, denn sie bringt doch eine Fülle neuer Feststellungen auf dem Gebiete der vergleichenden Hämatologie.

UYS DE VILLIERS PIENAAR ist Chefbiologe des Krügerischen Nationalparkes in Südafrika. Seine Monographie beschränkt sich auf die Beschreibung aller Blutkörperchenarten von 24 Reptilienspezies (62 Blutentnahmen) seines Arbeitsgebietes. Neben der Pappenheimfärbung wurde eine Peroxydasereaktion und die Sudanschwarzmethode angewandt. Die neuere europäische Literatur über vergleichende Hämatologie ist dem Autor weitgehend unbekannt. Große Schwierigkeiten bereitet auch ihm die Terminologie, insbesondere weil ihm als Zoologe die großen Erfahrungen der menschlichen Hämatologie kaum zur Verfügung stehen. Auf einer 4seitigen Tabelle führt er die von ihm benutzten Bezeichnungen und viele Synonyma an, illustriert sie aber glücklicherweise mit vielen guten Abbildungen auf 31 Tafeln und dazugehörigem Text. Wie sollte man sonst auch klar werden, was z. B. für Neutrophile gemeint sind unter den Bezeichnungen «giant vacuolated (senile) azurophil leucocytes», «plasmacytoid» «lymphocytoid» und «histiocytoid-azurophile» oder, bei den Roten, unter «lymphoid type erythroblast (lymphocyte-erythroblast transition)» «lymphoid type basophilic, polychromatophilic normoblasts» «lymphoid type pro-erythrocytes» usw.? Die Bezeichnung «azurophile» verschwindet beinahe vollständig unter den Eosinophilen I und Azurophilen, wobei für den Crocodilus niloticus richtig die echten Eosinophilen als Eosinophile II, die Neutrophilen als Eosinophile Typ I, entsprechend der vom Autor benutzten Terminologie bezeichnet werden. Mit der Auffassung des Autors, daß es im somatischen Leben der Tiere Übergangsformen der einen Blutzellart zur anderen geben würde, kann sich der Referent nicht befreunden. Immerhin ist es eine sehr gute deskriptive Arbeit, deren Wert noch erhöht wird durch die Bemühungen des Autors, in die Systematik der verschiedensten Haemoprotozoen, die bei den wilden Tieren – selbst bei uns in der Schweiz – so häufig sind, Ordnung zu bringen. Auch diese Monographie ist für vergleichende Hämatologen oder solche, die es werden wollen, bestens zu empfehlen, wenn sie es an der nötigen Kritik, wie gegenüber allen Pionierarbeiten, nicht fehlen lassen.

E. UNDRITZ, Basel

Nils Alwall. **Therapeutic and Diagnostic Problems in Severe Renal Failure.** Verlag Munksgaard, Kopenhagen, 1963, 744 S., 279 Abb., Preis Dän. Kr 402.–.

Der Monographie von N Alwall, Lund, Schweden, «Therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure» liegen Erfahrungen an 1057 Patienten zugrunde. Das 744 Seiten umfassende Werk läßt sich vor allem in drei große Abschnitte gliedern

) Technische Probleme betreffend apparativer Ausrüstung und räumlicher Organisation einer Nierenabteilung!

b) allgemeine diagnostische und therapeutische Probleme bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz und Anwendung der künstlichen Niere bei Intoxikationen und

) spezielle Kasuistik der 1057 behandelten Fälle.

Besonders im letzten Abschnitt wird augenfällig, wie vielseitig die Anwendungsmöglichkeiten der künstlichen Niere sind Akute Niereninsuffizienz verschiedenster Aetiologie, akute Glomerulonephritis, chronische Glomerulonephritis, akute und chronische Pyelonephritis, Obstruktionen der bleitenden Harnwege, Nephrosklerose usw

Alwall widmet sich in seinem Buche nicht nur der Anwendung der künstlichen Niere, sondern er erwähnt in ausführlicher Weise die konservativen Behandlungsmethoden des Nierenversagens. Die Monographie kann aus diesem Grunde nicht nur den Nephrologen, sondern auch den Allgemeininternisten und den Chirurgen zum Studium empfohlen werden.

Der allgemeine Eindruck, der durch Alwalls Monographie vermittelt wird, liegt vor allem darin, daß sich seit 1945 eine medizinische Spezialität in nicht voraussehbarem Maße entwickelt hat, und daß durch neue Erkenntnisse und neue apparative Einrichtungen vielen medizinischen und chirurgischen Patienten das Leben erhalten werden kann.

Tabellen, Reproduktionen von Röntgenaufnahmen und eine ausführliche Bibliographie (1387 Zitate) ergänzen das Buch in vorteilhafter Weise. H. Thölen, Basel

F Homburger: **Progress in Experimental Tumor Research.** Vol. 5. S. Karger AG, Basel/New York 1964 292 S., 76 Abb., 46 Tab., Preis sF ./DM 79.

F Homburger: **Progress in Experimental Tumor Research.** Vol. 6. S. Karger AG, Basel/New York 1965, XII + 340 S., 45 Abb., 57 Tab., Preis sFr /DM 85.

Die von F Homburger umsichtig redigierten «Progress in Experimental Tumor Research» haben in kurzer Zeit weite Verbreitung gefunden, so daß sich die Bände jetzt in kürzeren Zeitabständen folgen. Gemäß der ursprünglichen Konzeption bringen auch die beiden neuesten Bände 5 und 6 aktuelle Beiträge aus dem Gebiete der experimentellen Krebsforschung in monographischer Darstellung

In Band 5 berichtet K. Setälä, Helsinki, über «Defective Cell Maturation, an Alternative to Accelerated Cell Division as Target for Cancer Therapy». Er zeigt dabei neue Wege für die Krebstherapie auf. W F. Koch, Pittsburgh, Penns., versucht in seinem Beitrag «The Cause and Nature of Cancer» eine einheitliche Ursache der Krebsentstehung aufzudecken. Der Beitrag von F Bischoff und G. Bryson, Santa Barbara, Calif. «Carcinogenesis Through Solid State Surfaces» betont die grosse Bedeutung der Oberflächen von krebserzeugenden Stoffen, die neben den chemischen Faktoren nicht vernachlässigt werden dürfen.

C. M. Martin, Jersey City N. J berichtet über «Interactions of Hydrocarbon Carcinogens with Viruses and Nucleic Acids in vivo and in vitro» T L. Dao, Buffalo, N. Y gibt eine umfassende Darstellung über «Carcinogenesis of Mammary Gland in Rats» und hebt die Bedeutung des im Vergleich zum Mammakarzinom der Maus nur wenig bearbeiteten Mammakarzinomes der Ratte für die experimentelle Tumorforschung

hervor. Im Beitrag von B. A. Rubin, Radnor, Penna., «Carcinogen-Induced Tolerance to Homotransplantation» werden schließlich immunologische Krebsprobleme angeschnitten.

In Band 6 finden wir zuerst eine Arbeit von J. D. Almeida und A. W. Hak, Toronto, über «The Position of Oncogenic Viruses in a Classification of Viruses Based on Particle Morphology», in der versucht wird, den Begriff der oncogenen Viren morphologisch besser zu definieren. A. Axelrad, Toronto, schreibt über «Antigenic Behaviour of Lymphoma Cell Populations in Mice as Revealed by the Spleen Colony Method». Im nächsten Beitrag über «Effects of Anticancer Drugs on Biochemical Control Mechanisms» faßt J. F. Henderson, Edmonton, Alberta, die Literatur über biochemische Kontrollmechanismen von Antimetaboliten zusammen. Im ausführlichen Beitrag von F. J. C. Roe und Margaret A. Walters über «Some Unsolved Problems in Lung Cancer Etiology» werden neue Aspekte zur Aetiologie des Lungenkrebses aufgezeigt und die Kombinationen der Bronchialkrebse mit Cushing-Syndrom, Carcinoid-Syndrom, Hypercalcaemien, Myo- und Neuropathien diskutiert. Die beiden letzten Artikel von A. C. Sartorelli, New Haven, Conn., über «Approaches to the Combination Chemotherapy of Transplantable Neoplasms» und von H. O. Sjögren, Stockholm, über «Transplantation Methods as a Tool for Detection of Tumor-Specific Antigens» befassen sich mit immunologischen Problemen der experimentellen Tumorforschung.

Die meisten Beiträge bilden eine geglückte Synthese von Literaturübersicht und eigenen Forschungsergebnissen der Autoren, wobei noch etwas Platz für spekulative Hypothesen bleibt. Die Aktualität der gewählten Themen steht außer Zweifel. So dürften die «Progress in Tumor Research» weiterhin einen wichtigen Platz in der Bibliothek der an experimenteller Tumorforschung Interessierten einnehmen. F. Gloor, Basel

Acta haemat. 34: 257–276 (1965)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Kantonsspital Zürich
(Dir.: Prof. P. H. Rossier)

Die Osteomyelofibrose

Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom

Von H. E. Brunner

Das Osteomyelofibrose-Syndrom zeigt beim Vollbild *klinisch* die klassische Trias Hepatosplenomegalie, Knochenmarksfibrose und erythromyeloisches Blutbild. *Pathologisch-anatomisch* findet sich neben Retikulumzellwucherung und Myelofibrose bzw. Sklerose im Knochenmark eine myeloische Metaplasie extramedullärer Organe, insbesondere der Leber und Milz (13, 27, 38, 39). *Aetiologie* und *Pathogenese* sind unklar. Man betrachtet die Osteomyelofibrose als Krankheit sui generis oder als Endzustand myeloischer Leukämien und der Polycythaemia vera. Die Diagnose kann auf Grund des klinischen Bildes vermutet werden. Ihre Bestätigung erfolgt durch den Nachweis von retikulärer Hyperplasie und Fibrose in der Beckenkammbiopsie und extramedullärer Erythropoese in der Nadelbiopsie von Milz und Leber. Durch *Isotopenuntersuchungen* mit radioaktivem Eisen und Chrom konnte das Verständnis der Ferro- und Erythrocytenkinetik beim Osteomyelofibrose-Syndrom wesentlich gefördert werden. Die quantitative Erfassung der Erythrocytenkinetik vermittelt wertvolle Informationen über Intensität und Ort des Erythrocytenabbaues. Die Prüfung der Ferrokinetik erlaubt den Eisenumsatz sowie Ausmass und Ort der Erythrocytenproduktion zu bestimmen. Gleichzeitig können Erythrocyten-, Plasma- und totales Blutvolumen exakt gemessen werden.

In Ergänzung unserer früheren Mitteilung (9) soll über weitere ferro- und erythrokinetische Untersuchungen bei Osteomyelofibrosen berichtet werden.

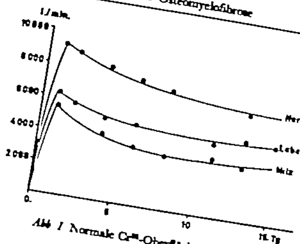
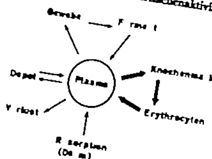


Abb 1 Normale Cr^{51}-Oberflächenaktivitäten



Plasma-F Turnover = 30 mg/24 h
27 mg/24 h = Erythropoese
1 mg/24 h = Gewebe
1 mg/24 h = Depot
1 mg/24 h = Verlust
= Resorption

Abb 2. Normaler Fe-Stoffwechsel.

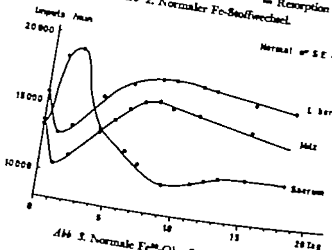


Abb 3. Normale Fe^{59}-Oberflächenaktivitäten

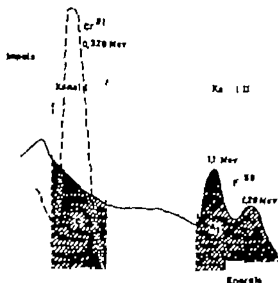


Abb. 4. Fe^{59}/Cr^{51}-Gammaspektrum.

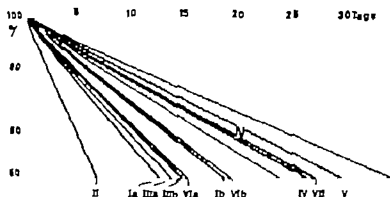


Abb. 5. Osteomyelofibrose $T_{1/2}$-Cr^{51}

Hughes-Jones *et al.* (29) beziehen Herz- und Milzaktivität auf 1000 Herzimpulse und berechnen die sog. zusätzliche Aktivität (excess counts) in Leber und Milz. Am einfachsten ist jedoch die Verwendung des Milz/Leber-Quotienten (30) d. h. des Quotienten der absoluten Meßwerte der Leber zur Milz. Er liegt normalerweise um 1. Bei Hämolyse in der Milz steigt er über 1, bei Hämolyse in der Leber fällt er unter 1 (Abb. 6, 7). Schwierig wird die Interpretation wenn Hämolyse in beiden Organen erfolgt. Eine intravasale Hämolyse wird durch Oberflächenmessungen nicht erfaßt.

Durchführung: Gleichzeitig mit den Blutentnahmen wird die Radioaktivität über Herz (3. ICR parasternal links), Leber und Milz (Intensivste perkutorische Dämpfung) gemessen. Berechnung der Milz/Leber-Quotienten und Graphik der Werte in ein lineares Koordinatensystem.

Normalbereich 0,5 – 1,5 (Abb. 6, 7).

3. Die Untersuchung der Ferrokinetik mit Fe^{59}

Die Untersuchung der Ferrokinetik mit radioaktivem Eisen wurde 1950 von Huff *et al.* (28) eingeführt und ist seither von zahlreichen Forschern ausgebaut worden (Lit. s. 7, 8, 10). Sie umfaßt die Bestimmung des Plasmaeisenumsatzes, des Radioeiseneinbaus in die Erythrocyten und der Eisenverteilung im Organismus.

) Die Bestimmung des Plasmaeisenumsatzes und des Plasmavolumens

Prinzip. Das gesamte Körpereisen ist in dauerndem Umsatz begriffen, wobei der Plasmaeisenspiegel mit 100 gamma% konstant gehalten wird (Abb. 2). Dies bedingt, daß die ins Plasma einströmende Eisenmenge immer gleich der abströmenden sein muß. Der Plasmaeisenumsatz (PET) erfolgt proportional der Plasmaeisenkonzentration (PE), dem Plasmavolumen (PV) und umgekehrt proportional der Eisenabwanderungsgeschwindigkeit aus dem Plasma. Die Eisenabwanderung aus dem Plasma folgt in erster Annäherung einer Exponentialfunktion, d. h. einer Geraden im semilogarithmischen Koordinatensystem. Als Maß der Abwanderungsgeschwindigkeit dient die effektive Halbwertszeit des Plasmaeisens (T½F). Sie ist definiert als der Zeitraum bis die Hälfte einer Eisenmenge (A) abgewandert ist. Durch Extrapolation der Geraden nach der Zeit Null läßt sich eine virtuelle Fe-59-Anfangskonzentration im Plasma bestimmen (T_0) und das Plasmavolumen nach dem Verdünnungsprinzip aus der applizierten Fe-59-Aktivität (A) berechnen ($PV = A/T_0$). Der Plasmaeisenumsatz berechnet sich nach folgender Formel

$$PET = 0{,}693 \; \frac{PE \quad PV}{T\tfrac{1}{2}F} \qquad 0{,}693 \text{ natürlicher Log von 2.}$$

Als Dimension wählt man mg Eisen pro Tag oder mg Eisen pro Tag und pro kg Korpergewicht. Nach intravenöser Applikation von mit radioaktivem Eisen markiertem Plasma (Transferrin) lassen sich Plasmavolumen und T½F bestimmen. Normalerweise beträgt T½F 60–90 Minuten (Abb. 8) und der Plasmaeisenumsatz 30 mg pro Tag d. h. das gesamte Plasmaeisen von 3–4 mg wird innerhalb 4 Stunden einmal umgesetzt. Aus Plasmaeisenumsatz, Erythrocytenvolumen, Lebensdauer der Erythrocyten und Eisengehalt des Hämoglobins (1 ml Erythrocyten enthält 1 mg Eisen) läßt sich die effektive Erythropoese (E) d. h. die für die Erythrocytenproduktion benötigte Eisenmenge berechnen. Den restlichen Anteil des Plasmaeisenumsatzes bezeichnet man als ineffektive Erythropoese (IE)

$$\frac{EV_{ml}}{MELD_{Tage}} = eE_{mgFe/Tag} = eE_{mg\,Fe/Tag}$$

$$PET_{mg\,Fe/Tag} - eE_{mg\,F/Tag} = IE_{mg\,Fe/Tag}$$

Unter normalen Verhaltnissen beträgt der Nicht-Erythropoese Eisenumsatz 30–50% des gesamten Plasmaeisenumsatzes.

Blutentnahme und Plasmamarkierung. Punktion von 50 ml venösem Blut in 10 ml ACD-Lösung enthaltende »Blutcons«-Flaschen. Zentrifugation während 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Separieren des Plasmas und Zugabe von 10 μC Fe^{59} Citrat (Fa. Abbott, Chicago spez. Aktivität 0,1 mC/ml). Inkubation während 30 Minuten bei Zimmertemperatur

Plasmainjektion und Blutentnahmen. Herstellung einer Standard-Lösung des markierten Plasmas. Intravenose Injektion von 10 ml markierten Plasmas mit gravimetrisch volumengeeichter Spritze. Punktion von je 10 ml Venenblut in 15minütigen Intervallen während der ersten Stunde nach Applikation des Fe^{59}. Hämatokritbestimmung aus der

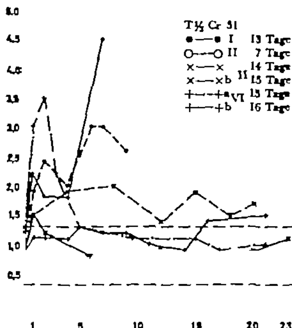


Abb. 6. Osteomyelofibrose: Milz-Leber-Quotienten mit Haemolyse in der Milz.

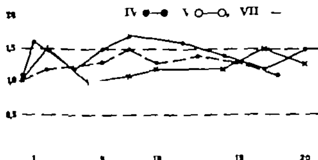


Abb. 7. Osteomyelofibrose: Milz-Leber-Quotienten ohne Haemolyse

ersten Blutprobe. Zentrifugation aller 4 Blutproben während je 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute.

Separieren des Plasma.

Messungen und Berechnungen: Messung der Plasmaaktivitäten (PA Imp/min/ml). Darstellung der Impulszahlen pro ml gegen die Zeit in ein semilog. Koordinatensystem. Es ergibt sich eine Gerade, mit welcher T½-Fe^{59} und die virtuelle Fe^{59}-Anfangskonzentration pro ml Plasma (T_0) graphisch ermittelt werden kann. Berechnung der gesamten injizierten Aktivität (A) aus der spezifischen Aktivität der Standardlösung ( ) und dem injizierten Volumen markierten Plasma (v) ($A_{imp/min}$ = imp/min/ml ml). Berechnung des Plasmavolumens nach dem Verdünnungsprinzip aus T und A. Berechnung des Plasmaeisenumsatzes. Berechnung der effektiven und ineffektiven Erythropoese (eE bzw. iE)

2. Resultate der Radioeisenstudien

Bei 7 Patienten (III – IX) konnte die Ferrokinetik gemessen werden, in den Fällen III und VI durch zweimalige Untersuchung.

a) Plasmaeisenclearance, Plasmavolumen und Plasmaeisenumsatz. T½-Fe^{59} war immer verkürzt (Tab. III, Abb. 8), die Plasmavolumina normal oder entsprechend der Verminderung des Erythrocytenvolumens erhöht (Tab. III). 6mal (IIIa, IV, V, VI, VIII, IX) war der Plasmaeisenumsatz gesteigert und 1mal (VII) normal. In 2 Fällen (III, VII) erfolgte der Eisenumsatz proportional der Erythropoese und war der ineffektive Eisenumsatz nicht vermehrt (Tab. III). Die Fälle IV, V und VI) zeichneten sich durch eine gesteigerte ineffektive Erythropoese aus.

b) Radioeiseneinbau in die Erythrocyten. Der Fe^{59}-Einbau erfolgte bei 3 Fällen (V, VII, IX) normal, in 4 (IIIa, IV, VIa, VIII) deutlich vermindert und war in 2 Fällen (IIIb, VIb) praktisch aufgehoben (Abb. 9, Tab. III).

c) Fe^{59}-Aktivität an der Körperoberfläche. Der Verlauf der Oberflächenkurven über Milz und Sacrum war immer pathologisch, über der Leber unauffällig. In allen Fällen bestand extramedulläre

Tabelle I

...ologische Befunde bei 9 Fällen von Osteomyelofibrose (EV Erythrocytenvolumen, PV Plasma... ...tales Blutvolumen, ME mittleres Eisen..., LEBK latente Eisenbindungskapazität, T... Eisenbindungskapazität)

Name	Hb g%	Ery 10^6/mm³	Ret ‰	Hkt korr. %	EV ml	EV ml/kg	PV ml	PV ml/kg	TV ml	TV ml/kg	ME γ%
H.B.	8	3,3	53								
	9	_,8	8								
W.P. ♀		1,9	54								
S.K. ♀	10,_	5,_	_5	1_,9	670	1_	2910	52	3580	64	120
				14,4	680	1_	4140	70	4715	62	259
I.A.	13,1	3,0	32	41,4	1605	–	2390	40	3993	67	[illegible]
P.P. ♀	1_,6	4,1	–	37,8	1585	29	2900	54	4575	83	85
G.J. ♀	11,_	3,9	33	29	1430	15	3390	43	4820	62	80
	6,	_,3		15,3	865	13	5020	73	3305	88	108
S.F.	11,0		29	–	1710	19	2390	36	3530	73	22
C.R. ♂	–	3,5	3	–	1360	23	3160	23	4520	77	36
D.S. ♂	9,8	4,5	13	33,1	1_0_	25	3450	5_	_570	77	45
*Normwerte	—	—	—	44	1771	29	2333	42	3256	70	102

* ...ner und Frauen zusammen

Berechnungen.

a) aus Hämatokriterythrocyten (B_H Imp/min/ml Erythrocyten) und Plasmavolumen (PV ml)

$$ICR = \frac{PV \cdot B_H \cdot K}{A \cdot (100-Hkr)} \cdot 10$$

b) aus der Vollblutaktivität (BA_H Imp/min/ml Blut) und Erythrocytenvolumen (EV ml)

$$ICR = \frac{EV \cdot BA_H \cdot K}{A \cdot Hkr} \cdot 10^4$$

K: Korrekturfaktor für Hämatokritschwankungen Ht_0/Ht_n
Normalwerte: 73–97%, Mittel 88% am 10. Tag

[illegible]) Messung der Fe^{59}-Aktivität an der Körperoberfläche

Prinzip. Durch Messung der Fe^{59}-Aktivität über Leber, Milz und Knochenmark (Sacrum) kann die Eisenverteilung im Organismus festgestellt werden. Die Messungen erfolgen simultan mit den Blutentnahmen zur Bestimmung des Radioeiseneinbaus. Die Aktivitäten werden absolut (C_t Imp/min) oder relativ bezogen auf die injizierte Aktivität (μC) oder eine Ausgangsaktivität (C_0) kurz nach Injektion des Fe^{59} als Funktion der Zeit in ein lineares Koordinatensystem aufgetragen (Lit. s. 7, 8, 10). Der Verlauf dieser Organkurven entspricht den Eisenverschiebungen zwischen verschiedenen Verteilungsräumen (Abb. 3). Die Aktivität über dem Sacrum steigt innerhalb 24 Stunden auf einen maximalen Wert. Entsprechend der Zunahme der Erythrocytenaktivität im peripheren Blut fällt sie wieder ab. Umgekehrt verhalten sich in dieser Zeit die Kurven von Leber und Milz. Nach 2–3 Wochen kehren alle zum Ausgangswert zurück.

Durchführung: 1. Oberflächenmessung über Leber, Milz (Meßstellen [illegible] Dämpfung) und Sacrum möglichst kurz nach Applikation des Fe^{59}. 2. Anschließend an den Tagen der Blutentnahmen je 1 Messung. 3. Graphik der absoluten Meßwerte (Imp/min) gegen die Zeit in Tagen in ein lineares Koordinatensystem (Abb. 3).

3. Die simultane Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik mit radioaktivem Eisen (Fe^{59}) und Chrom (Cr^{51})

Mit Entwicklung der modernen Strahlenmeßtechnik, vor allem von Szintillationszählern und Energiediskriminatoren, wurde es möglich, die Untersuchungen mit Fe^{59} und Cr^{51} simultan durchzuführen. Eingeführt wurde das kombinierte Radioeisen/Radiochrommethode 1955 durch Wasserman und Bethard (46); seither ist es von zahlreichen Untersuchern verbessert worden (Lit. s. 7, 8). Das Prinzip der simultanen Messung von Cr^{51} und Fe^{59} basiert auf den unterschiedlichen, mit einem Impulshöhenanalysator getrennt registrierbaren Gamma-Spektren (Abb. 4). Die Photopeaks des Fe^{59} von 1,1 und 1,29 MeV können leicht am obern Rand des Energiespektrums im Kanal II eingestellt werden (A_{II}). Im Photopeak des Cr^{51} (0,32 MeV) finden sich noch Comptonund Rückstreuimpulse des Fe^{59} (C). Diese sekundäre Eisenaktivität (A_{Fe}) ist proportional der Aktivität A (A = k · A). Die Konstante k läßt sich experimentell bestimmen und die eigentliche Cr^{51}-Aktivität (B) durch Subtraktion der in Kanal I gemessenen Aktivität A_I von der Aktivität C berechnen ($B = C - A_{Fe}$). Bei in vitro-Messungen im Bohrlochkristall ist der Proportionalitätsfaktor leicht bestimmbar. Schwierig liegen die Verhältnisse bei in vivo-Messungen an der Körperoberfläche. Infolge der von Individuum zu Individuum verschiedenen geometrischen Verhältnisse ist die Ermittlung des Proportionalitätsfaktors erschwert. Seine Bestimmung ist nur annäherungsweise durch Messung von Wasserphantomen möglich.

Durchführung Grundsätzlich ist das simultane Radioeisen/Radiochromstudium eine Kombination der beschriebenen Einzelverfahren. Punktion von 50 ml Venenblut in 15 ml ACD-Lösung enthaltende «Baxter Flaschen» Zentrifugation während 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Separieren von 15 ml Plasma und Markierung mit 20 µC Fe^{59} Markierung der konzentrierten Erythrocyten mit 100 µC Cr^{51} Injektion der markierten Erythrocyten. Nach 30 Minuten Punktion von 10 ml Venenblut zur Erythrocytenvolumenbestimmung Gleichzeitig Injektion des mit Fe^{59} markierten Plasmas. Bestimmung von Eisenabwanderungsgeschwindigkeit aus dem Plasma, Plasmavolumen, Plasmaeisenumsatz, Eiseneinbau in die Erythrocyten, Halbwertzeit des Erythrocytenchroms und Messung der Fe^{59} und Cr^{51} Aktivitäten an der Körperoberfläche.

Normalwerte s. S. 3.

EV_{Cr} = 950 – 2800 ml bzw 26 – 32 ml/kg, im Mittel 1701 ml bzw 29 ml/kg. (Tab. I und II)

Ergebnisse

1 Resultate der Radiochromstudien

a) Erythrocytenvolumina (Tab I) Das Erythrocytenvolumen wurde in 7 Fällen bestimmt. Es war entsprechend dem tiefen Hämoglobinwert bei 5 Fällen (III VI VII VIII IX) vermindert und in 2 (IV V) normal.

b) Halbwertszeit des Erythrocytenchroms (Tab III Abb 5) Bei 7 der 9 untersuchten Patienten konnte T½-Cr^{51} bestimmt werden. 3 (IV V VII) wiesen eine normale T½-Cr^{51} auf, bei 3 (I III VI) lag T½-Cr^{51} zwischen 10 und 20 Tagen und nur in 1 Fall (II) unter 10 Tagen.

c) Die Cr^{51} Aktivität an der Körperoberfläche konnte bei 7 Kranken (I–VII) gemessen und die Milz/Leber-Quotienten berechnet werden (Tab III) Sie waren bei allen Patienten mit verkürzter T½-Cr^{51} (I II III VI) *pathologisch* (Abb 6) bei den Fällen mit normaler T½-Cr^{51} (IV V VII) zwischen 1 0 und 1 6 (Abb. 7) Alle Patienten wiesen eine Splenomegalie auf. In 4 Fällen (I, II, IIIb, VIa) sprechen die Milz/Leber-Quotienten zwischen 1 7 und 4 7 für Hämolyse in der Milz, in 2 Fällen (IIIa, VIb) ist der Milz/Leber Quotient trotz stark verkürzter T½-Cr^{51} von 14 bzw 19 Tagen im Bereich der Norm, obwohl eine erste Untersuchung (VIa) auf Hämolyse in der Milz hinwies. Für Hämolyse in der Leber fanden sich in unserem Krankengut keine Anhaltspunkte. Von Bedeutung für die Lokalisierung der Hämolyse ist ein pathologischer Milz/Leber Quotient über einen längeren Zeitraum. Dies trifft für die Fälle I II und IIIb zu

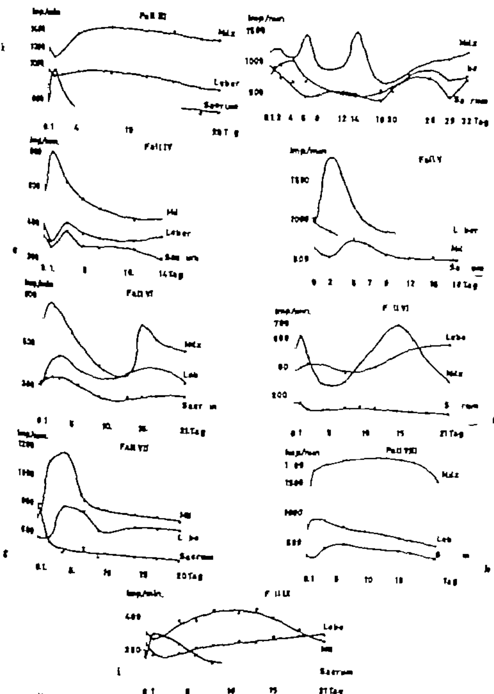


Abb. 10 Fe^{59}-Oberflächenaktivitäten a) Fall III a, b) Fall III b, c) Fall IV d) Fall V e) Fall VI a, f) Fall VI b, g) Fall VII h) Fall VIII i) Fall IX

2 Resultate des Radioeisenstudiums

Bei 7 Patienten (III – IX) konnte die Ferrokinetik gemessen werden in den Fällen III und VI durch zweimalige Untersuchung.

a) Plasmaeisenclearance Plasmavolumen und Plasmaeisenumsatz. T½-Fe⁵⁹ war immer verkürzt (Tab III, Abb. 8) die Plasmavolumina normal oder entsprechend der Verminderung des Erythrocytenvolumens erhöht (Tab. III) 6mal (IIIa, IV V VI, VIII, IX) war der Plasmaeisenumsatz gesteigert und 1mal (VII) normal. In 2 Fällen (III VII) erfolgte der Eisenumsatz proportional de Erythropoese und war der ineffektive Eisenumsatz nicht vermehr (Tab. III) Die Fälle IV V und VI) zeichneten sich durch ein gesteigerte ineffektive Erythropoese aus.

b) Radioeiseneinbau in die Erythrocyten. Der Fe⁵⁹ Einbau erfolgt bei 3 Fällen (V VII, IX) normal, in 4 (IIIa, IV VIa, VIII deutlich vermindert und war in 2 Fällen (IIIb, VIb) praktisch aufgehoben (Abb. 9 Tab III)

c) Fe⁵⁹ Aktivität an der Körperoberfläche Der Verlauf der Oberflächenkurven über Milz und Sacrum war immer pathologisch über der Leber unauffällig. In allen Fällen bestand extramedullär

Tabelle I

…ematologische Befunde bei 9 Fällen von Osteomyelofibrose (EV Erythrocytenvolumen; PV P… / totales Blutvolumen ME manifestes Plasmaeisen LEBK: latente Eisenbindungskapazität; Eisenbindungskapazität)

Fall	Name	Hb g%	Lc 10³/mm³	Retic ‰	Hämatokrit %	EV ml	EV ml/kg	PV ml	PV ml/kg	TV ml	TV ml/kg	ME γ%
	H.B. ♀	8	3,3	55								
		9	2,8	8								
	W.P. ♀	7,7	1,9	54								
(	S.K. ♂	10,2	3,2	25	18,9	680	12	2910	52	3590	64	125
ib					14,4	680	12	4040	70	4715	82	250
	I.A. ♀	14,1	5,0	32	41,4	1605	27	2390	40	3995	67	70
	P.P. ♀	12,8	4,1	22	37,8	1595	29	2980	54	4575	83	85
	G.J. ♀	11,2	3,9	33	29,7	1430	18	3390	45	4820	61	80
.b		6,7	2,5	7	15,3	885	13	5020	75	5305	68	100
I	S.F. ♀	11,0		29	27	1000	19	2890	56	3890	75	87
11	C.R. ♂	7,2	3,3	20	27	1360	23	3160	23	4520	77	50
:	D.S. ♂	9,8	4,6	16	35,1	1710	25	3660	52	5370	77	45
Mittlere Normalwerte*		—	—	—	44	1701	28	2535	42	3256	70	102

Erythropoese in der Milz. Die Interpretation des Kurvenbildes bereitete oft Schwierigkeiten. Einfach liegen die Verhältnisse in den Fällen IV V VII und VIII Sie zeigen eine typische Erythropoesekurve über der Milz, wie sie normalerweise über dem Sacrum registriert werden kann, und fehlende Aktivität über dem Knochenmark (Abb 10) Sehr instruktiv sind die 2gipfligen Milzkurven in den Fällen IIIb VIa, VIb (Abb. 10e, f) Der zweite Gipfel ist durch Reutilisation des durch Hämolyse vorzeitig frei gewordenen Fe^{59} bedingt. Das 2. Maximum der Milzaktivität korreliert mit der verkürzten T½-Cr^{51} Auch diesen Fällen fehlt die erythropoetische Knochenmarksaktivität vollständig

Tabelle II

Halbwertszeit des Erythrocytenchroms (T½-Cr^{51}) und mittlere Lebensdauer der Erythrocyten (MELD) nach Dornhorst et al. (17)

T½-Cr^{51} Tage	MELD Tage	Destruktionsrate (1 = normal)
1	1,5	82
2	3	40
3	4,6	26
4	6,3	19
5	8	15
6	10	12
7	12	10,1
8	14	8,6
9	16	7,5
10	18	6,6
11	21	5,8
12	23	5,2
13	26	4,6
14	29	4,2
15	32	3,8
16	35	3,4
17	38,5	3,1
18	42	2,8
19	46	2,6
20	50	2,4
21	54	
22	60	
23	66	
24	72	
25	77	
26	86	Nicht mehr streng
27	93	richtig, weil
28	102	Elution keine
29	112	Exponentialfunktion
30	120	mehr

Tabelle III

Ferro- und Erythrocytenkinetik bei 9 Fällen von Osteomyelofibrose

Fall N	T½-F min.	PET mg/Fe/Tag	PET mg/Fe/Tg/kg	ICR %/Tg	MELD T½ Cr	MELD MELD Cr
I	—	—	—	—	13	26
Ib	—	—	—	—	19	46
II	—	—	—	—	7	12
III	16	52,4	0,9	40/12	14	29
IIIb	30	32,2	0,6	2/7	15	32
IV	16	100,0	1 7	56/14	27	120
V	48	50,5	0,9	97/15	30	120
VI	32	81,6	1 0	63/13	13	32
VIb	38	228,1	3,3	4/10	19	46
VII	32	19,0	0,4	97/16	27	120
VIII	36	42,2	0,7	40/5	—	—
IX	19	83,2	1 1	100/15	—	—
	56—93	22—50	0,55—0,74	73—89	24—35	120
Normalwerte	71	36	0,6	88/10	30	

Diskussion

Wesentliche Ursache der *Anämie* bei Osteomyelofibrose ist die *verkürzte Erythrocytenlebensdauer* Bei unseren 7 mit Cr^{51} untersuchten Fällen bestand viermal deutliche Hämolyse. Am gesteigerten Erythrocytenabbau spielt – abgesehen von der minderwertigen Konstitution der Erythrocyten – auch die Splenomegalie im Sinne des Hypersplenismus eine Rolle (31 42 43) Trotz Splenomegalie kann aber die Lebensdauer in vereinzelten Fällen normal sein (IV V VII) Die Hämolyse erfolgt in Milz, Leber oder in beiden Organen zugleich. Ihre Lokalisierung durch Messung der oberflächlichen Chromaktivität bereitet infolge der großen Fehlerbreite der Methode erhebliche Schwierigkeiten. In allen unsern Fällen mit verkürzter Lebensdauer der Erythrocyten fand sich ein pathologischer Milz/Leber Quotient entsprechend einer Hämolyse in der Milz. Vermehrten Erythrocytenabbau in der Leber konnten wir nie nachweisen.

Die zweite Komponente der Anämie ist die *verminderte Erythropoese* Dies geht aus dem meist herabgesetzten und nur selten normalen (V VII IX) Radioeiseneinbau in die Erythrocyten hervor Der Anstieg der Inkorporationskurve erfolgt verzögert (Abb. 9) und fällt vorzeitig entsprechend der verkürzten Lebensdauer der Erythrocyten wieder ab Trotzdem ist der gesamte *Plasmaeisenumsatz* normal oder sogar gesteigert bei beschleunigter Eisenabwanderung

Tabelle III Fortsetzung

Eff. Erythropoese mg/Fe/T	Ineff. Erythrop. mg/Fe/Tg	Milz/Leber Quotient Cr51	Erythropoese (Fe59) Knochenmark	Milz	Leber	Splenomegalie
—	—	2,0—4 7	—	—	—	+
—	—	—	—	—	—	+
—	—	2,1—3,3	—	—	—	+
23,4	29	1 0—1 7	++	+	—	+
21,3	10,9	1 7—2,1	—	+++	—	+
13,4	66,6	1,2—1,6	—	+++	—	+
13,3	37,2	1 1—1,5	—	+++	—	+
44,7	36,9	1 1—3,7	—	+++	—	+
19,3	208,8	1 1—1 7	—	+++		+
8,3	10,7	1,0—1,3	—	+++	—	+
—	—	—	—	+++	—	+
—	—	—	++	+	—	+
9—23	6—35	0,5—1,6	+++	—	—	—
14	21					

aus dem Plasma. Er liegt daher über dem für die Erythropoese erforderlichen Bedarf und ist zum grossen Teil ineffektiv Nur einmal (*III b*) fehlte in unserem Krankengut diese Diskrepanz zwischen gesamtem Plasmaeisenumsatz und effektiver Erythropoese. Auch andere Autoren beobachten diese ineffektive Erythropoese (26 36 43) Ihre Pathogenese ist schwer verständlich Eine mögliche Erklärung wäre Abbau der Erythroblasten bereits im Knochenmark bzw den extramedullären Blutbildungsherden. Nur ein Teil der Erytroblasten könnte ausreifen und ausschwemmen. Gegen diese Hypothese spricht aber der «Eisenleerlauf» bei normaler Erythrocytenlebensdauer (IV V VII) und die meist normalen oder sogar erhöhten Reticulocytenwerte. Diese Diskrepanz zwischen verminderter effektiver Erythropoese und normaler bzw vermehrter Reticulocytenzahl wird durch Annahme zweier Erythrocytenpopulationen erklärbar Eine kurzlebige würde innerhalb Stunden nach Ausschwemmung hämolysiert, während die zweite Population eine längere oder sogar normale Lebensdauer aufwiese. Der Begriff der ineffektiven Erythropoese würde definitionsgemäss die kurzlebige Erythrocytenpopulation erfassen (24) Eine Korrelation zwischen unreifen Erythroblasten im peripheren Blut und ineffektiver Erythropoese besteht nicht (43) Eine weitere Deutung der ineffektiven Erythropoese wäre vermehrter Eisenaustausch zwischen Plasma und Depotorganen, vor allem Speicherung von Radioeisen ohne Utilisation in der vergrößerten Milz als Folge des vermehrten

Blut bzw. Plasmagehaltes. Durch Splenektomie unmittelbar nach der Tracerapplikation konnten aber HAURANI et al. (26) diesen Mechanismus ausschließen. Gegen eine vermehrte Eisenabwanderung in die Leber spricht in unseren Fällen die unauffällige oberflächliche Fe^{59}-Aktivität.

Die *extramedulläre Erythropoese* kann durch Messung der oberflächlichen Fe^{59}-Aktivität nachgewiesen werden. Meist – wie auch in unseren Fällen – erfolgt sie in der Milz. Andere Autoren stellten sie auch in der Leber fest. Die mehr oder weniger ausgeprägte bis fehlende Eisenaktivität über dem Sacrum zeigt das Ausmaß der Rest-Erythropoese im Knochenmark (IIIa, IX). Hervorgehoben seien unsere beiden Fälle (IIIb, VI) mit 2gipfliger Erythropoese-Kurve über der Milz als Ausdruck einer Reutilisation des aus der Hämolyse frei gewordenen Fe^{59}. Die Milzkurve kann auch einen plateauartigen Verlauf nehmen (VIII, IX): das aus dem Erythrocytenabbau befreite Eisen wird nicht mehr vollständig reinkorporiert.

Unsere Resultate der kombinierten Radioeisen-/Radiochrom-Untersuchung bei Osteomyelofibrose korrelieren mit denjenigen anderer Autoren (2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47).

Kann auf Grund der oberflächlichen Eisenaktivität die Erythropoese in die Milz lokalisiert werden, ist selbstverständlich eine Splenektomie oder eine Strahlenbehandlung der Milz kontraindiziert. Fehlt eine lienale Erythropoese oder weist die oberflächliche Chromaktivität auf intensive Hämolyse hin, steht einer Splenektomie nichts im Wege. Diese Indikation ist auch gegeben, wenn die Erythropoese ausschließlich oder vorwiegend in der Leber stattfindet. Die Isotopenuntersuchungen mit Fe^{59} und Cr^{51} ergeben heute eine Erklärung für den empirisch bekannten unterschiedlichen Erfolg einer Splenektomie bei Osteomyelofibrosen.

Einer besonderen Besprechung bedürfen unsere *Fälle II und I.* Der Hämoglobinbedarf kann durch die extramedulläre Erythropoese weitgehend gedeckt werden und die Erythrocytenlebensdauer ist normal. Der Eisenumsatz ist weit über den für die Erythropoese erforderlichen Bedarf gesteigert. Dieses Zusammentreffen einer normalen Lebensdauer der Erythrocyten mit «Eisenleerlauf» beobachten wir auch bei Polycythaemia vera (6, 11). Die Möglichkeit einer Differenzierung des Osteomyelofibrose-Syndroms, vor

allem eine Abgrenzung der aus Polycythämien hervorgegangenen Fälle wäre bedeutungsvoll. Schwierig zu interpretieren sind die Befunde im *Fall VII*. Trotz Anämie besteht die Kombination von normaler Erythropoese (normaler Radioeiseneinbau, mäßige Reticulocytose) ohne Hämolyse (normale $T^1{}_{\frac{1}{2}}$-Cr^{51}). In den übrigen Fällen kann die hämolytische Komponente der Anämie trotz gesteigerter Erythropoese nicht kompensiert werden. Der verminderte Radioeiseneinbau ist Ausdruck der Hämolyse.

Radioeisen und Radiochromstudium haben das pathogenetische Verständnis der Osteomyelofibrose wesentlich gefördert. Die Anämie resultiert aus Hämolyse, verminderter Erythropoese oder Kombination dieser beiden Mechanismen. Die Erythropoese ist normal oder meist gesteigert, erfolgt jedoch zu einem großen Teil ineffektiv und genügt nicht zur Gewährleistung eines normalen Erythrocytenvolumens oder Kompensation einer Hämolyse. Die Ursache des «Eisenleerlaufs» ist unklar. Theoretisch kann er durch vorzeitigen Abbau der Erythroblasten an den medullären und extramedullären Produktionsstätten, eine kurzlebige Erythrocytenpopulation oder einen gesteigerten Eisenaustausch zwischen Plasma und Depotorganen erklärt werden. Die Erythropoese erfolgt medullär, extramedullär oder an beiden Orten zugleich. Meist ist im Ablauf der Erkrankung ein allmähliches Verschwinden der medullären und Einspringen der extramedullären Erythropoese zu beobachten. Erst terminal bricht auch die extramedulläre Blutbildung zusammen. Der Erythrocyten-Abbau erfolgt normal oder meist gesteigert. Die Hämolyse dürfte sowohl durch die Produktion minderwertiger Erythrocyten als auch sekundär durch den Hypersplenismus bedingt sein. Durch Messung der oberflächlichen Chromaktivität kann die Hämolyse in Leber und Milz lokalisiert werden; sie kann aber auch intravasal erfolgen. Es gibt Fälle (IV, V) mit genügender meist vollkommen extramedullärer Erythropoese ohne gesteigerte Erythrocytendestruktion und mit extrem gesteigertem «Eisenleerlauf», welche erst sehr spät eine Anämie entwickeln. Möglicherweise handelt es sich dabei um Fälle von Polycythaemia vera mit allmählichem Übergang in Osteomyelofibrose.

Die Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik bei Osteomyelofibrose erlaubt, das Ausmaß einer Hämolyse und die Erythropoese zu erfassen, die Indikation zur Splenektomie zu stellen und das Osteomyelofibrose-Syndrom pathogenetisch zu differenzieren.

25. Gray S. and Sterling, K.: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J clin. Invest. 29 1604 (1950)
26. Haurani, F L. and Tocantins, L. M.: Ineffective erythropoesis. Amer J Med. 31 519 (1961)
27 Hueck, G: Zwei Fälle von Leukämie mit eigentümlichem Blut- resp. Knochenmarksbefund. Virchow Arch. 78. 475 (1879)
28. Huff R. L. Hennessy L. G Austin, R. E. Garcia, J F; Roberts, B. M and Lawrence, J H. Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoietic disorders. J clin. Invest. 29/II 1041 (1950).
29 Hughes-Jones, N C. and Szur, L. Determination of sites of red cell destruction using Cr^{51}-labeled cells. Brit. J Haemat. 3. 320 (1957)
30. Jandl, J H. Greenberg, M. S.; Yonemoto, R. H. and Castle, W B. Clinical determination of the sites of red cell destruction. J clin. Invest. 34 390 (1955).
31 Keiderling W Rehbinder, L. Dechiler, W und Hoffmann, G Klinische Studien über die Kinetik des Eisens. Nuclear Med. 2. Suppl. 1 81 (1963)
32. Loeb, V Moore, C. V and Dubach, R. The physiologic evaluation and management of chronic bone marrow failure. Amer J Med. 15. 499 (1953)
33 Liddle, E. M. and Baxter, C. F Some clinical applications of techniques w tracer dosis of Fe^{59} Radioisotope Conference 1954 (Johnston, London 1954).
34 Mertis Bu. L. Boiron, M.; Padilla, C. Christol, D; Tubiana, M. Bousser, J Contribution à l'étude physiopathologique des splénomégalies myéloïdes avec myélofibrose. Rév Hémat. 12 445 (1957)
35. Nathan, D G and Berlin N I Studies of the production and life span of erythrocytes in myeloid metaplasia. Blood 14 668 (1959)
36. Oettgen, H. F und Pribilla, W Die Erythrokinetik bei Osteomyelofibrose. (Untersuchung über die Produktion und Destruktion der Erythrocyten mit Cr^{51} und Fe^{59}) Klin. Wschr 42 483 (1964)
37 Pollycove, M. Ferrokinetics techniques in Keiderling Eisenstoffwechsel (Thieme Stuttgart 1960)
38. Rohr, K. Myelofibrose und Osteomyelosklerose. Acta haemat. 15. 209 (1956).
39. Rohr, K. Das menschliche Knochenmark (Thieme, Stuttgart 1960).
40 Schapira, G et Dreyfus, J C. Physiopathologie de l'hémoglobine et du globule rouge étudiée à l'aide du fer radioactif. Sang 24 142 (1953).
41 Schwartz, L. Wasserman, R. L.; Starkey L. Tendler, D. and Vroman, L. Observations on extramedullary hematopoesis in myelofibrosis using radioiron techniques. Proc. 6th Congr Int. Soc. Hematol. Boston, 1956 (Grune & Stratton, New York 1958)
42. Strumia, M. M. Dugan, A. Taylor, L.; Strumia, P V and Bonnet D. Splenectomy in leukaemia and myelofibrosis. Amer J clin. Path. 37 491 (1962).
43. Szur, L. and Smith M. D Red-cell production and destruction in myelosclerosis. Brit J Haemat. 7 147 (1961).
44 Ventura, S. Marinone, V Impiego clinico del Fe^{59} quale mezzo di indagine semeiologica del ricambio del ferro. Min. Nucl. 1 74 (1954)
45. Wasserman, L. R. Rashkoff I. A. Leavitt D; Mayer, J and Port S The rate of removal of radioactive iron from the plasma. An index of erythropoesis. J clin. Invest. 31 32 (1952)
46. Weinstein I M. and Beutler, E. The use of Cr^{51} and Fe^{59} in combined procedure to study production and destruction in normal human subjects and in patients with haemolytic or plastic anemia. J Lab. clin. Med. 45. 616 (1955).
47 Wetherley-Mein G. and Hutt M. S. R. Radioactive iron studies in routine Haematological Practice. Brit. med. J i. 1443 (1956).

Adresse des Autors: Dr H. E. Brunner Medizinische Univ.-Klinik, Kantonsspital, Zürich (Schweiz).

Acta haem. t. 34 277-290 (1965).

Institut de Clinique médicale et de Thérapie médicale de l'université
(Directeur Prof. Paolo Introzzi)

Altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans myélose érythrémique aiguë

Par P. Introzzi, L. Bufcarini et Antonia Notario

Qu'on a eu une description de la myélose érythrémique aiguë fut décrite pour la première fois en 1926 par Giovanni di Guglielmo (11), qui depuis 1917 (10) avait fait remarquer la possibilité d'une atteinte maligne de la série érythroblastique. Tous les cas de la littérature témoignent d'une rareté rélative de cette forme (260 sujets environs), bien qu'ils comportaient à illustrer cette maladie, il y a de nombreux problèmes dignes d'être éclaircis.

Nous ne voulons pas discuter la position nosologique controversée de la myélose érythrémique aiguë (selon quelques uns c'est une maladie autonome, un syndrome polyphasique avec une inévitable participation de la série blanche selon les autres). Nous voulons plustôt montrer quelques aspects de la biologie de la série rouge, jusqu'à maintenant mal connus ou encore ignorés, et relater les résultats tirés d'un cas d'érythrémie aiguë avec des altérations morphologiques et métaboliques significatives des érythroblastes et des érythrocytes.

Altérations érythroblastiques

Une grande quantité d'anomalies morphologiques et évolutives de l'érythroblaste érythrémique été soulignée par plusieurs auteurs. Bernardelli et coll. (3) ont reconnu une réduction évidente du rhythme prolifératif, avec un désordre de la reproduction homo- et hétéroplastique. L'incorporation exigue du ^{32}P ou de la thymidine ^{3}H dans le noyau de l'érythroblaste érythrémique est une preuve de ce phénomène (16, 14). En particulier on observe une incapacité des érythroblastes de mûrir (11); ce phénomène pourrait être attribué selon Baldini et coll. (2) à une erreur d'utilisation de la vitamine B_{12}. Les auteurs décrivent dans leurs sujets une association de mégaloblastose et des taux élevés de vitamine B_{12} dans le sérum). Cette interprétation est en contraste, néanmoins, avec la notion que la mégaloblastose est très variable dans la

maladie érythrémique et ce les données d' utres auteurs (13) qui ont trouvé un métabolisme normal de la itamine B_1 ou bien une concentration éduite dans le sérum (15). En outre Braw et coll. (9) ont demontré que le mégaloblaste érythrémique survivant en vitro n est pas normalisé par la itamine B_{12} de l'acide folique et de l'acide folinique, qui accentuent presque d'une manière paradoxale ses charactéristiques anormales. Des altérations ni ea du métabolisme protéique semblent oir été soulignées par l incorporation peu bondante de méthionine ^{35}S (16) et par la forte augmentation de la leucine LD-^{3}H (14).

On doit juger comme manifestation abnorme du biochimisme cellulaire la présence du matériel PAS-positif dans le cytoplasme (2, 26, 13), qui serait formé par du glycogène (absence de la positivité au PAS dans les frottis préalablement soumis à la digestion par la salive).

Les études sur les ultrastructures de l'érythroblaste érythrémique de Gos et Grouzeli (12) ont démontré le phénomène de acuolisation du cytoplasme, une quantité anormale de ferritine et une diminution d nombre des mitochondres. La dernière donnée n pas été confirmée par Braw (5).

Le cas de myélose érythrémique aiguë que nous avons examiné, démontre dans la moelle une évidente hyperplasie de la série érythroblastique et un nombre bien élevé des phases de maturation moins avancées. Il en résulte que l activité mitotique érythroblastique atteint les limites au dessous de la norme on remarque même la tendance des mitoses érythroblastiques au blocage en métaphase.



Fig. 1 Transformation érythroblastique médullaire avec des anomalies mitotiques. Contraction des chromosomes à forme de balle.

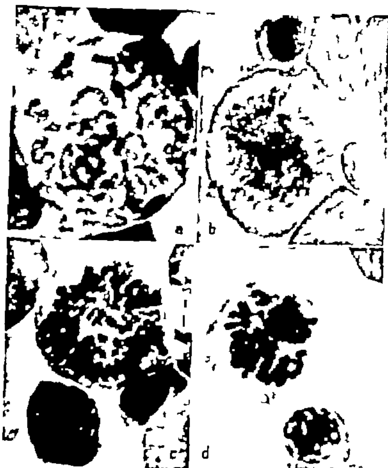


Fig. 2 Exemple d'anomalies mitotiques des érythroblastes) métaphase irrégulière b) mitose bipolaire) contraction des chromosomes d) conglutination des chromosomes.

Les éléments érythroblastiques montrent de nombreuses atypies la présence de proérythroblastes à dérivation directe des cellules histiocytaires, avec une lignée irrégulière du cytoplasme des altérations des figures mitotiques (unoriented metaphase) la conglutination des chromosomes dans la phase du monastère (balle metaphase) la contraction des chromosomes à forme de balle la dégénération nucléaire des cellules, la pycnose des chromosomes et enfin l'apparition des chromosomes à pont. A tout cela il faut ajouter des *altérations évolutives consistentes en mitoses* polyploïdes ou pluripolaires avec la formation d éléments parfois de

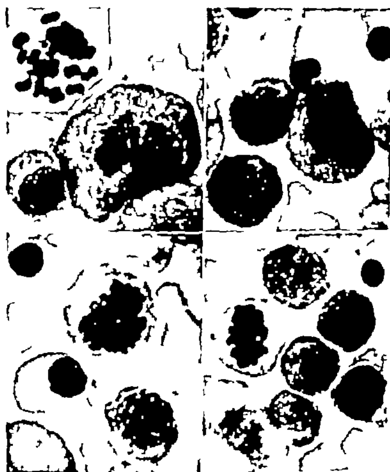


Fig 3 Contraction à forme de balle conglutination et pycnose des chromosomes.

dimensions gigantesques à deux ou plusieurs noyaux, fréquemment avec noyaux d aspect différent des altérations des noyaux dans l interphase l homogénisation, les condensation irrégulières, les lyses nucléaires ou pycnoses, les gemmations et encore des altérations cytoplasmatiques telles que une irrégulière basophilie et une vacuolisation (fig 1 2 et 3)

La réaction PAS démontre que la plupart des éléments érythroblastiques (surtout dans les phases de maturation moins avancées) contient du matériel Schiff positif Son aspect est variable et par conséquence il y a une coloration répandue du cytoplasme, des petites granulation à la périphérie, et très rarement des inclusions cytoplasmatiques grossières.



Fig. 4 Inclusions de ferritine avec configuration différentes, quelques fois grossières, dans le cytoplasme d'un érythroblaste

La réaction toujours presque négative dans les érythroblastes acidophiles, est négative dans les érythrocytes. Le traitement des frottis avec de la salive ne modifie pas le résultat de la réaction. La coloration par le noir de Sudan signale l'absence de matériel lipidique dans les éléments de la ligne érythroblastique.

Les études sur l'ultrastructure des éléments de la moelle osseuse, après fixation du matériel dans la solution de Palade et son inclusion en araldite, démontrent l'existence de nombreuses altéra



Fig. 5. Phénomènes de vacuolisation dans le cytoplasme d'un érythroblaste. La flèche montre une inclusion de ferritine environnée d'une double membrane

tions, telles qu'un aspect histioïde des cellules *proérythroblastiques*, avec des mitochondries de nombre presque normal, qui sont dans la plupart des cas petits et presque ronds. On rémarque de nombreuses inclusions de ferritine qui se présentent sous la forme d'amas ou bien de petits grains isolés. L'aspect du cytoplasme érythroblastique n'est pas régulier à cause de la présence d'extensions. Il y a des phénomènes de vacuolisation cytoplasmatique, parfois très évidents (fig. 4–7)

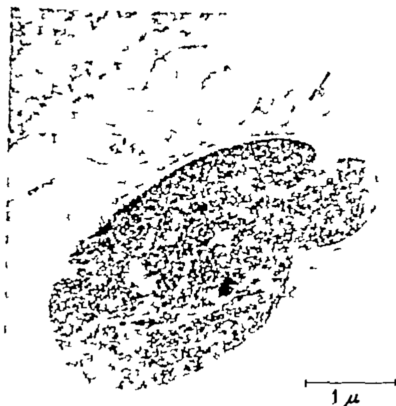


Fig. 6. Erythroblaste à silhouette déchiquetée. Phénomènes de vacuolisation. A l'intérieur d'un acuole il y un amas de parcelles très denses (flèche)

Altérations érythrocytaires

Une des causes de l'anémie de la myélose érythrémique aiguë est la destruction exagérée des érythrocytes, associée à une réduction parfois remarquable de la durée de vie des globules rouges. Ce phénomène pas été entièrement illustré en ce qui concerne son essence, mais il est en général ramené aux anomalies des hématies érythrémiques. La remarque de Wırrz et coll. (30) sur la présence d'une hémoglobine anormale, proche de la Hb H par quelques propriétés, 'a pas été confirmée. Par contre nous 'avons pas trouvé d'études sur le taux d'enzymes et sur le charactère du métabolisme érythrocytaire dans la myélose erythrémique aiguë.

Notre cas de myélose érythrémique présente les signes d une hyperhémolyse accentuée et un nombre de réticulocytes presque normal. Les résistances osmotiques et méchaniques des hématies sont inférieures à la norme. La durée de vie des érythrocytes marqués par le chrome radioactif (^{51}Cr) est réduite à 50‰.

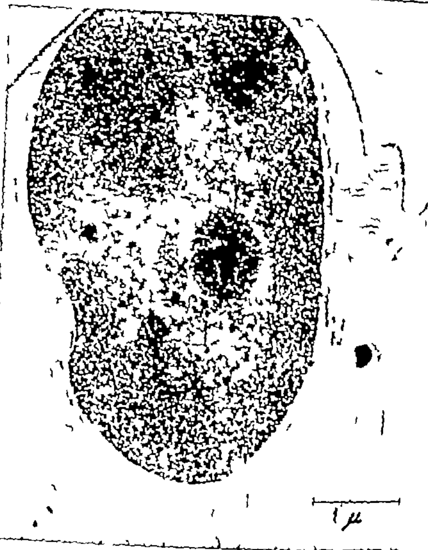


Fig. 7 Phénomènes très marqués de vacuolisation du cytoplasme d'un érythroblaste

Les *characteristiques* des *hémoglobines* à l'électrophorèse *étaient normales*. La consommation d'oxygène des hématies était légèrement inférieure à la norme. Par contre les valeurs de la glycolyse anaérobienne étaient fort diminués fort basse (tabl. I). Le *tableau I montre* que parmi les ferments de la voie glycolytique seulement l'aldolase est strictement anormale. L'activité de la glucose-6-déshydrogénase et de la *transcétolase* est *normale* tandis que l'activité de la 6-P-gluconate-déshydrogénase dépasse la norme. La concentration érythrocytaire de la glutathione réductase

est normale, celle de la déshydrogénase malique et de la transaminase glutamico-pyruvique n est pas beaucoup inférieure à la norme, et les valeurs de la transaminase glutamico-oxaloacétique sont extrêmement réduites (à moins d 1/10 par rapport aux contrôles)

Le contrôle de l activité glycolytique des érythrocytes avec de la glucose marquée par le ^{14}C a confirmé ces observations. La radioactivité érythrocytaire après incubation des cellules pendant 1h avec la glucose 1 ^{14}C et la glucose U ^{14}C respectivement a demontré toujours un réduction des valeurs d incorporation de deux radionuclides (pour la méthode de determination voire 23) Néanmoins l'exploitation du glucose U ^{14}C en aérobiose est presque identique chez les sujets normaux et chez notre malade érythrémique, tandis que celle du glucose-1 ^{14}C est plus évidente chez ce dernier (tabl. II)

Tableau I

Utilisation d'oxygène (en mm³ de O_2/h/10⁹ cellules) méthode de WARBURG (30) glycolyse anaérobienne (en mm³ de CO_2/h/10⁹ cellules), méthode de WARBURG (30)- Activités enzymatiques Aldolase (Ald) méthode de BRUNS (6); glycéraldéyde 3-P déshydrogénase (GA-3-PD) méthode de VELICK (29); pyruvate-kinase (PK) méthode de BÜCHER ET PFLEIDERER (8); glucose-6-déshydrogénase (G-6-PD), méthode de KORNBERG ET HORECKER (21) 6-P-gluconate-déshydrogénase (6-PGD) méthode de HORECKER ET SMYRNIOTIS (19) transcétolase (TC), méthode de HORECKER ET SMYRNIOTIS (18); glutathione-réductase (GR) méthode de RACKER (27) malico-déshydrogénase (MDH) méthode de HESS ET GEHM (17) transaminase glutamico-oxaloacétique (TGO) méthode de KARMEN et coll. (20) transaminase glutamino-pyruvique (TGP), méthode de KARMEN et coll. (?0)

	O_2	Glycolyse	Ald	GA-3-PD	PK	G-6-PD
Erythrémie aiguë	6,0	6,9	9,3	7 7	6,0	7,0
Valeurs normales	7 1 ± 1 4	11,8 ± 1 7	16,8 ± 2,9	7,0 ± 1,9	3,4 ± 1,6	7 1 ± 1,9

	6-P-GD	TC	GR	MDH	TGO	TGP
Erythrémie aiguë	7,8	13,2	9,0	9.200	16,1	1,02
Valeurs normales	2,9 ± 1,2	17,6 ± 2,1	9,5 ± 1 7	12.860 ± 680	143 ± 8,9	122 ± 9,6

Les valeurs de l'activité aldolasique son données en U BRUNS/10⁹ cellules les valeurs des activités malico-déshydrogénasique, transaminase glutamico-oxaloacétique et transaminase glutamico-pyruvique sont données en U WROBLEWSKI/10⁹ cellules et les valeurs des autres activités enzymatiques sont données en unités arbitraires, dont 1 unité corresponde à la quantité d enzyme dans 1 ml d échantillon capable d'entraîner une modification de l'absorption de 0,1 à 340 mμ, à 25°C et pendant une minute.

Les modifications de la glycose ne sont pas la seule expression d'une modification du métabolisme erythrocytaire dans l'érythrémie. Elles sont accompagnées d'altérations de la synthèse protéique et du métabolisme des aminoacides. Comme le tableau II montre, l'utilisation érythrocytaire de la glycine 1-^{14}C par les érythrocytes érythrémiques est globalement réduite, et cette réduction est en relation avec une évidente diminution du taux de substances oxydés à $^{14}CO_2$. Au contraire la radioactivité des protéines et des polypeptides érythrocytaires est toujours augmentée dans les érythrocytes érythrémiques en comparaison aux érythrocytes de sujets normaux. L'utilisation cellulaire de la cystine-^{35}S est presque identique. La quantité globale utilisée est légèrement réduite et la quantité d'aminoacides incorporés dans les protéines et les polypeptides cellulaires est augmentée. La réduction globale de l'utilisation est de son côté attribuable à une baisse évidente de l'exploitation de la cystine avec délivraison de soufre inorganique radioactive.

Tableau II

Valeurs absolues et valeurs en pour cent d'utilisation érythrocytaire de la glucose 1-^{14}C, de la glucose U-^{14}C, de la glycine 1-^{14}C et de la cystine-^{35}S, chez les sujets normaux et le malade d'érythrémie aiguë, après incubation des cellules à 38 °C, selon les modalités signalées de NOTARIO et coll. (25). Les valeurs sont données en c/min/10^9 cellules.

Fractions considérées	Erythrémie aiguë Valeurs abs.	V.r.%	Sujets normaux Valeurs abs.	V.r.%
Glucose 1-^{14}C				
Radioactivité du $^{14}CO_2$	249	61,5	141 ± 27	39,9
Radioactivité cellulaire	157	38,5	212 ± 31	60,1
Quantité globale utilisée des érythrocytes	406		353 ± 30	
Glucose-U-^{14}C				
Radioactivité du $^{14}CO_2$	80	20,0	82 ± 18	14,7
Radioactivité cellulaire	320	80,0	474 ± 52	85,3
Quantité globale utilisée des érythrocytes	400		556 ± 48	
Glycine 1-^{14}C				
Radioactivité du $^{14}CO_2$	203	18,5	421 ± 86	37,8
Radioactivité des protéines	550	50,2	489 ± 58	44,0
Radioactivité des polypeptides	342	31,3	210 ± 34	18,2
Quantité globale utilisée des érythrocytes	1095		1110 ± 63	
Cystine-^{35}S				
Radioactivité des protéines	1652	37,4	1067 ± 112	22,7
Radioactivité des polypeptides	214	4,8	115 ± 18	2,4
Radioactivité du soufre inorganique	2540	57,6	3518 ± 139	74,9
Quantité globale utilisée des érythrocytes	4406		4700 ± 116	

Discussion et Conclusions

Parmi les altérations érythroblastiques (morphologiques, évolutives et cytochimiques) que nous avons observées à propos d'un cas de myélose érythrémique aiguë nous avons attribué une signification particulière aux modifications de l'ultrastructure. Les phénomènes de vacuolisation cytoplasmatique avec des aspects érythroblastiques fréquemment «presque absurdes» sont une expression du trouble profond des cellules, qui sont destinés à l'avortissement local ou à la formation d'érythrocytes à vitalité réduite.

L'examen au microscope électronique démontre aussi d'inclusions de ferritine polymorphes chez un nombre élevé d'érythroblastes. Le phénomène est lié aux altérations du métabolisme du fer. En effet les valeurs de clearance plasmatique du ^{59}Fe sont augmentés, tandis que l'incorporation du fer radioactif dans les érythrocytes est très réduite (2, 28). De ces observations on peut conclure, que la production d'hémoglobine, évaluée selon le turnover plasmatique du fer est très élevée. Elle est de même réduite d'une façon remarquable si l'on considère la quantité de fer utilisé par les érythrocytes. Ce phénomène est le signe d'une érythropoïèse inefficace.

Les résultats obtenus à propos de la constitution enzymatique et du métabolisme des érythrocytes nous permettent de mieux établir le second élément patogénétique de l'anémie dans la myélose érythrémique aiguë, la destruction anormale des érythrocytes. L'hyperhémolyse est attribuable à une altération intracellulaire. Nos résultats montrent une chute de la glycolyse anaérobique, avec une réduction de la concentration de l'activité aldolasique sans modification des autres activités enzymatiques de la glycolyse anaérobienne. Vu l'importance de ce défaut enzymatique, il faut se souvenir que parmi les enzymes des érythrocytes, normalement réduits en comparaison à ceux des cellules nucléés, l'activité aldolasique est au niveau le plus bas (7). On comprend par conséquence comme cette réduction, bien que légère, soit capable de ralentir d'une façon évidente les processus glycolytiques (24). De même on doit considérer que l'exploitation anaérobienne de la glucose est la plus importante source énergétique de l'érythrocyte (4) indispensable à la conservation de l'équilibre ionique.

Nous devons souligner aussi la chute très marquée de l'activité de la transaminase glutamico-oxaloacétique, bien que les valeurs

de l'activité glutamico-pyruvique soient presque normales. Nous ne pouvons pas interpréter ce phénomène, néanmoins nous désirons souligner que déjà INTROZZI et coll. (22) ont observé un procédé analogue chez les leucocytes leucémiques.

Les modifications de la glycolyse des érythrocytes chez notre malade érythrémique sont confirmées par le contrôle du procédé de la glycolyse, effectué à l'aide de la glucose marquée par le ^{14}C en position 1. L'exploitation de la glucose-U-^{14}C en aérobiose est presque identique chez les érythrocytes normaux et érythrémiques tandis que celle de la glucose 1-^{14}C est plus évidente chez les derniers. Nous avons interprété ce phénomène comme une preuve d'une majeure activité de la voie glycolytique de EMBDEN-MEYERHOF chez les érythrocytes érythrémiques et comme confirmation indirecte d'une activité réduite de la voie glycolytique normale avec exaltation de la voie oxydative directe pour alternative métabolique.

Bien que les altérations les plus évidentes se trouvent au niveau de la glycolyse anaérobique, nous avons observé aussi des modifications du métabolisme protéique. Ces sont les modifications de l'utilisation de la glycine et de la cystine, avec réduction de l'utilisation globale des deux substances et augmentation relative de leur incorporation dans les protéines et les polypeptides. Nous avons interprété ces modifications comme l'expression d'une réduction des processus oxydatifs cellulaires dans l'érythrémie, avec augmentation moderée de la synthèse protéique, d'un façon analogue à ce que nous avons observé chez les leucocytes leucémiques (25). Ces variations métaboliques, en conclusion, temoignent un trouble évident du métabolisme cellulaire dont il est aujourd'hui presque impossible de suivre tous les aspects. Des recherches plus poussées permettront de mieux éclarcir la signification de ces altérations, qui sont parmi les plus intéressantes dans cette maladie.

Résumé

Chez un cas d'érythrémie aiguë des altérations évidentes des images microscopiques ont été observées. L'examen au microscope électronique a permis de relever des inclusions de ferritine dans les cytoplasme des érythroblastes et une vacuolisation très évidente. Les érythrocytes montrent des anomalies métaboliques et enzymatiques remarquables: une réduction de la glycolyse anaérobienne; une diminution de l'incorporation de la glucose 1-^{14}C et de la glucose U-^{14}C ainsi que de l'utilisation de la glycine 1-^{14}C et de la cystine-^{35}S, et une chute des activités de l'aldolase et de la transaminase glutamino-oxalacétique.

Summary

Marked mitotic changes were found in patient with acut ery ... microscopic examination showed ferritin inclusions and extens ... cytoplasm of the erythroblasts. The erythrocytes showed remarkab ... enzymatic anomalies reduction of anaerobic glycolysis reduced glucose-1 ^{14}C and glucose U-^{14}C and utilization of glycine 1 ^{14}C and decreased aldolase and glutamine oxalacetic transaminase activity

Zusammenfassung

Bei einem Patienten mit akuter erythrämischer Myelose fanden sich Veränderungen der Mitosebilder. Elektronenmikroskopisch wurden im Zyt pl Erythroblasten Einschlüsse von Ferritin und eine starke Vakuolisierung nachgew. Die Erythrozyten zeigten Anomalien des Stoffwechsels und der Enzyme eine Vern derung der anaeroben Glykolyse, eine Herabsetzung des Einbaues von Glukose 1 ^{14}C und on Glukose-U^{14}C, sowie der Verwertung on Glycin-1 ^{14}C und C tin-^{14}C und ein Abfall der Aktivitäten der Aldolase und der Glutamin-Oxalessigsäure Transaminase

Bibliographie

1. Astaldi, G. and Tolentino, P. Studies in vitro on maturation of erythroblasts in normal and pathological conditions. J clin. Path. *2* 217 (1949)
2. Baldini, M.; Fudenberg, H.; Fukutake, K. and Dameshek, W. The anemia of Di Guglielmo syndrome Blood *14* 334 (1959).
3. Bernardelli, E. Mele, V and Bani, M Experimental research on the proliferative activity of the erytroblasts in chronic erythremia, the chronic form of Di Guglielmo disease. Blood 9 609 (1956)
4. Bernstein, R. E. Rates of glycolysis in human red cells in relation to energy requirement for cation transport. Nature *172*. 911 (1953).
5. Bessis, M. et Thiery J P Etude au microscope électronique des hémosarcomes humains. III. Leucémies à cellules-souches, érythrémies, réticulolymphosarcomes, maladie de Hodgkin, plasmocytomes Nouv Rev franç. Hémat. *2*. 577 (1962)
6. Bruns, F Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase Biochem. Z. 325. 156 (1954)
7. Bruns, F Über die Aldolase der Erythrozyten. Biochem. *Z* *325* 429 (1954)
8. Bücher, T and Pfleiderer, G Pyruvate Kinase from Muscle in *Colowick* and *Kaplan* Method in Enzymology ol I p. 323, Academic Press, New York 1955)
9. Bomi, L. Pizzi, F Carrara, P M. Tagliaferri, D Contributo sperimentale alla conoscenza del megaloblast eritremico. Haematologica lat. *2* 229 (1960)
10. Di Guglielmo, G Ricerche di ematologia I U caso di eritroleucemia Folia med., *13*. 386 (1917)
11. Di Guglielmo, G Eritremie acute Boll. Soc Med. Chir Pavia *40* 663 (1926)
12. Di Guglielmo, G. Le malattie eritremiche ed eritroleucemiche Pensiero Scient. Ed., Roma (1960)
13. Gardikas G. Nordén, A and S ... K. O. Cytochemical investigations and serum vitamin B_{12} determinations ... case of erythroleukemia Acta Med. scand. *171* 243 (1962)
14. G ... otto, F Marani, G ... Pi ... A. Radioautographic investigations on DNA and protein metabolism in 2 cases of Di Guglielmo disease Blood *16* 1122, (1960)
15. Gibson, I I Pollock, A. and S ... I Di Guglielmo syndrome with low serum vitamin B_{12} Postgrad. med J 37 ... (19 ...)

21

de l'activité glutamico-pyruvique soient presque normales. Nous ne pouvons pas interpréter ce phénomène, néanmoins nous dérons souligner que déjà INTROZZI et coll. (22) ont observé un procédé analogue chez les leucocytes leucémiques.

Les modifications de la glycolyse des érythrocytes chez notre malade érythrémique sont confirmées par le contrôle du procédé de la glycolyse, effectué à l'aide de la glucose marquée par le ^{14}C en position 1. L'exploitation de la glucose U ^{14}C en aérobiose est presque identique chez les érythrocytes normaux et érythrémiques tandis que celle de la glucose 1 ^{14}C est plus évidente chez les derniers. Nous avons interprété ce phénomène comme une preuve d'une majeure activité de la voie glycolytique de EMBDEN-MEYERHOF chez les érythrocytes érythrémiques et comme confirmation indirecte d'une activité réduite de la voie glycolytique normale avec exaltation de la voie oxydative directe pour alternative métabolique.

Bien que les altérations les plus évidentes se trouvent au niveau de la glycolyse anaérobique, nous avons observé aussi des modifications du métabolisme protéique. Ces sont les modifications de l'utilisation de la glycine et de la cystine, avec réduction de l'utilisation globale des deux substances et augmentation relative de leur incorporation dans les protéines et les polypeptides. Nous avons interprété ces modifications comme l'expression d'une réduction des processus oxydatifs cellulaires dans l'érythrémie avec augmentation moderée de la synthèse protéique d'un façon analogue à ce que nous avons observé chez les leucocytes leucémiques (25). Ces variations métaboliques, en conclusion, temoignent un trouble évident du métabolisme cellulaire, dont il est aujourd'hui presque impossible de suivre tous les aspects. Des recherches plus poussées permettront de mieux éclarcir la signification de ces altérations, qui sont parmi les plus intéressantes dans cette maladie.

Résumé

Chez un cas d'érythrémie aiguë des altérations évidentes des images mitotiques ont été observées. L'examen au microscope électronique a permis de relever des inclusions de ferritine dans les cytoplasme des érythroblastes et une acidification très évidente. Les érythrocytes montrent des anomalies métaboliques et enzymatiques remarquables: une réduction de la glycolyse anaérobienne; une diminution de l'incorporation de la glycine-1-^{14}C de la glucose 1 ^{14}C et de la glucose-U-^{14}C ainsi que de l'utilisation de la glycine-1-^{14}C et de la cystine-^{35}S et une chute des activités de l'aldolase et de la transaminase glutamino-oxalacétique.

Acta haemat. 34: 291–300 (1965)

The Thalassaemia Syndromes

V. Cooley's Anaemia with Low Level of Fetal Haemoglobin. A Genet[illegible] in Four Families

By M. Aksoy and S. Erdem

Istanbul Medical School, Capa Internal Clinic, Vakif Guraba Hospital, Istanbul

Fetal haemoglobin detected by alkali denaturation (1) was found in large quantities in Cooley's anaemia. All investigators agree that the level of fetal haemoglobin varies considerably, namely between 10 and 90% (2,3). According to Silvestroni and Bianco (4) and Beaven *et al.* (5) the average levels of alkali resistant haemoglobin were high, 41 and 50% respectively. As it is generally accepted, there is no correlation between the amount of fetal haemoglobin and the haematologic severity of thalassaemia major (6, 7). Furthermore Smith *et al.* (8) have rightly indicated that there is no clear relationship between the level of alkali resistant haemoglobin and the presence or absence of the spleen (8).

Although in Cooley's anaemia fetal haemoglobin is present in large quantities, in some cases reported by several investigators the quantity of alkali resistant haemoglobin was comparatively low varying between 10.8 and 20 (2, 9).

During the recent years we performed haemoglobin analysis of 48 patients with thalassaemia major. Although the level of fetal haemoglobin was high in 44 of them, varying between 12.5 and 95%, it was exceptionally low (2 5 3 2 and 7 6) in four cases of Cooley's anaemia.

The purpose of this paper is to report four patients with thalassaemia major exhibiting very low levels of fetal haemoglobin

---

Very low levels of fetal haemoglobin, such as 1.6, 3.5, 3.8, 4.7 and 6.1 … have been found in some cases of Mediterranean anaemia reported from Thailand by Minnich et al. (10). But later reinvestigation of these patients by paper electrophoresis (11) showed that some of them were examples of thalassaemia-haemoglobin E disease. Therefore, we were not inclined to include these cases with low fetal haemoglobin in this group.

below 10° and to discuss several genetic concepts which might explain the basic defect of thalassaemic syndromes.

Methods

The haematological methods were all standard techniques. Haemoglobin determinations were made on Klett-Summerson photoelectric colorimeter. Fetal haemoglobin was determined by the method of ... *et al.* (1). Haemoglobin A_2 was determined by the method of discontinuous TRIS buffer paper electrophoresis, by starch block electrophoresis and also by starch gel electrophoresis (12 16). The maximum normal values for haemoglobin A_2 in these methods were 3.5 in the first two and 4 in the last one.

Case Reports

Case 1. A 9 year-old Turkish girl from Istanbul was referred to our laboratory for haemoglobin analysis. She has been noted to be anaemic since early childhood. She was hospitalized often in pediatric clinics in Istanbul because of anaemia and jaundice and was diagnosed as having COOLEY anaemia. Physical examination revealed an anaemic looking girl with normal stature. Her sclerae were subicteric. The spleen was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated a

Table I

Haematologic data on four patients with COOLEY's anaemia exhibiting low levels of fetal haemoglobin.

Haematologic Data	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
RBC (10^6 cu. mm.)	3.70	2.00	3.80	2.00
Hb (g)	8.2	4.5	8.8	4.6
WBC cu. mm.	16.000	8.000	16.500	13.500
Reticulocytes ( )	4	3.5	4	14
Haematocrit ( )	24	16	29	16
MCV (cu μ	65	80	70.4	80
MCHb (μμ g	—	22.5	21	23
NRC 100 WBC	1	2	5	3
Anisocytosis	+ + +	+ +	+ +	+ +
Polychromatophilia	+	+		+ +
Poikilocytosis	+ +	+ +		+
Microcytosis	+ + + +	+		+ +
Hypochromia	+ + +	+ +		+
Target-cells	+	+		+
Total bilirubin mg)	1.8	1.8	1	3.7
Osmotic fragility NaCl)	.4–.18	.48–.26	.4–.26	.4–.16
Serum iron (μ g*	87	140	85	
Direct Coombs test	—	—		—
Fetal haemoglobin	7.6	3.2	5	
Haemoglobin A_2	5*	1.4	9*	
G-6P-D screening test	Normal			

Not determined
Performed by Dr. H. LEHMANN in 1955.
Performed by starch block electrophoresis (14
Performed by discontinuous TRIS buffer paper electrophoresis 12, 13
Performed by starch gel electrophoresis 13, 16

Table II

Haematologic data on the family members of four cases of COOLEY anaemia with low levels of fetal haemoglobin.

Family	RBC 10⁶/mm³	Hb g%	Hct	MCV	MCHC %	Retic %	Osmotic fragility (% NaCl)	Target cells	Hb F %	Hb A₂ %
Family 1										
Mother	5.40	10.8	41	74	20	1.5		+	3	
Father	5.20	12	48	92	23	1	46–.26	+	0	
Sister	5.00	11	40	80	22	1		+	0	6
Family 2										
Mother	4.90	10	40	83	23	1.5	44–.28	+ + + +	3.5	2
Father	5.50	13	45	84	24	1	46–.28	+ +	0	7
Family 3										
Mother	4.65	12.1	41	88	26	1	48–.3	+	0	7
Father	5.40	14.4	50	92	26.6	0.5	44–.36	—	0	4
Family 4										
Mother	4.60	10.8	37	80	23.5	2	46–.26	+	0	
Father	5.10	13.7	45	88	27	1	44–.26	+	0	

Not determined.
Performed by starch block electrophoresis (14)
Performed by starch gel electrophoresis (15, 16)

striking thickening of the diploe with mild trabecular striation and marked osteoporosis with "honey-combed" appearance around the elbow joint. The laboratory data are summarized in Table I.

Family study: Both parents were Turkish immigrants from Bulgaria. The mother, 39 year old woman, had stigmata of thalassaemia minima, including increased haemoglobin A₂. Her father, 41 year old man, had stigmata of thalassaemia minima including increased haemoglobin A₂. A healthy sister, 14 year-old girl, had mild stigmata of thalassaemia minima including increased haemoglobin A₂. Their haematologic data are summarized in Table II.

Case 2. A 2 3/12 year-old Turkish boy from Thrace was referred to our laboratory for haemoglobin analysis. The boy was almost normal until 6 months when anaemia, lassitude and mild jaundice appeared. He was hospitalized several times in pediatric clinics in Istanbul and was diagnosed as having COOLEY's anaemia. He was transfused several times when anaemia was very severe. The last transfusion was performed nearly 3 months ago. Physical examination revealed a very pale looking boy with subicteric sclerae. He had mongoloid facies and frontal bossing. The spleen was enlarged three fingerbreadths and the liver one fingerbreadth below the costal margin. His haematologic data are summarized in Table I. X-ray of the skeleton revealed moderate osteoporosis around the elbow joint.

Family study: His parents were in good health. The mother, 29 year old woman, had mild stigmata of thalassaemia minima including slightly elevated haemoglobin F. The father, 38 year-old man, had mild stigmata of thalassaemia minima including increased haemoglobin A₂. One sister died at the age of four of anaemia similar to her brother's illness. Their haematologic data are summarized in Table II.

Case 3. A one year-old Turkish boy from Istanbul was referred to the outpatient department of the 2nd Internal Clinic of Istanbul Medical School for haemoglobin analysis. H was anaemic and icteric for three months. Physical examination revealed very pale and mildly subicteric boy. The spleen was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated moderate thickening of diploic space on frontal area and osteoporosis of the elbow joints and of the bones of the hands. The splenic puncture revealed a moderate extramedullary erythropoiesis with 65 of nucleated red cells. The laboratory data are recorded in Table I.

Family study. Both parents were alive and both were in good health. They are not relatives. The mother, a 29 year-old woman, had mild stigmata of thalassaemia minima including increased haemoglobin A_2. The father 36 year old man, had no findings of thalassaemia minima including normal levels of haemoglobin A_2 and F. Their haematologic findings are summarized in Table II.

Case 4. A one year-old Turkish boy from Mersin was brought to the outpatient department of Mersin State hospital because of anaemia, jaundice and lassitude in 1955. He has been noted to be anaemic and icteric for six months. Now and then, he had irregular fever and diarrhoea of short duration. Physical examination revealed a very pale and subicteric boy. The spleen extended to the crest and the liver was enlarged three fingerbreadths below the costal margin. A bone survey demonstrated a moderate osteoporosis around the elbow joints. The laboratory data are summarized in Table I. The splenic puncture disclosed mild extramedullary erythropoiesis with 3 orthochromatic normoblasts.

Family study. His parents were relatives. Both had the mild stigmata of thalassaemia minima. Their haematologic data are recorded in Table II.

Discussion

As will be seen from the case reports and tables, our four patients represent the severe or moderately severe form of thalassaemia major. They exhibit all clinical and haematologic stigmata characteristic of this congenital haemolytic anaemia, such as marked hepatosplenomegaly, the morphologic abnormalities, the corpuscular constants, the increased osmotic resistance of the erythrocytes, signs of increased haemolysis and hypochromic microcytic anaemia. Genetic patterns of these patients are consistant with that of COOLEY's anaemia. The results of haemoglobin analysis obtained from the families 1 and 2 indicate that the cases 1 and 2 are beta-thalassaemic homozygotes. In both parents of cases 1 and 2 increased amounts of either haemoglobin A_2 or haemoglobin F have been found. Therefore cases 1 and 2 are beta thalassaemic homozygotes. On the other hand, the results of the family study of case 3 show that the mother is asymptomatic beta thalassaemic heterozygote (increased haemoglobin A_2). The father, on the contrary, is apparently normal and exhibits no haematologic findings that would indicate the presence of a thalassaemia gene (haemoglobins A_2 and F are within normal limits). The father may possibly be considered an asymptomatic carrier of a gene responsible for

alpha-thalassaemia. As the family study of case 4 was ... in 1955, haemoglobin A_2 determinations were n... Therefore, it is impossible for us to decide whether ... an alpha and beta thalassaemic heterozygote or a be... n homozygote. According to the genetic concept of ... STRETTON (17) a homozygotic state for alpha thal... compatible with life after delivery On the contrary Q... (18) recently reported a case of homozygous alpha th... with normal level of fetal haemoglobin at the age of 3 ... fore, the possibility of homozygosity for alpha thalassaemi... also be considered in case 4

The results of haemoglobin analysis relating to the four patie... with COOLEY's anaemia were of great interest, as the levels of fetal haemoglobin were less than 10% (2, 5 5 2 and 7 6) This results



Fig 1 Starch gel electrophoresis at borate buffer 0.025 M, pH 8 6. From left to right Hb. F A + F + increased A_2 (thalassaemia major with low level of fetal haemoglobin Hb. F 52% and 7.6 and Hb. A_2 5) A + F + increased A_2 (COOLEY' anaemia: Hb. F 52% and Hb. A_2 Hb. A_2 4 6) S + F + A_2 (sickle cell-anaemia Hb S 78%, Hb. F 19% and Hb. A_2 2.1%) Hb. A + Hb A_2 (normal) The gel was photographed after staining with Buffalo-Black in methanol.

20. Marks, P. A., Gerald, P. and Christy, N.: The thalassemia syndromes. Biochemical, genetic and clinical considerations. Amer. J. Med. 36: 919 (1964).
21. Vavra, J. D.; Mayer, V. K. and Moore, C. V.: In vitro heme synthesis by human blood: abnormal heme synthesis in thalassemia major. J. Lab. clin. Med. 63: 736 (1964).
22. Ingram, V. M.: The Hemoglobins in Genetics and Evolution, p. 113 (Columbia Univ. Press, New York 1963).
23. Burka, E. and Marks, P. A.: Ribosomes active in protein synthesis in human reticulocytes. A defect in thalassemia major. Nature *199:* 706 (1963).
24. Vavra, J. D. and Mayer, V. K.: *In vitro* porphyrin synthesis by human blood: porphyrin synthesis by thalassemic erythrocytes. J. Lab. clin. Med. 63: 734 (1964).

Authors' address: Drs. M. Aksoy and S. Erdem, Istanbul Med. School, Çapa Internal Clinic, Vakif Gureba Hosp., *Istanbul* (Turkey).

Acta haemat. 30 301–304 (1963)

Department of Oncology Hadassah University Hospital, Jerusalem

The Effect of Typhoid Vaccine Injection of Partial Body Irradiated Rats

By E. Robinson and A. Hochman

It is well known that partial body irradiation produces leukopenia. It is not celar whether this is only due to a direct effect on the irradiated area or also to an indirect effect by a factor having an influence beyond the treated area (1 2) Typhoid vaccine injection has biphasic influence on the white blood cells. In the first hour there is a fall in the leucocyte count due to the sequestration of cells in the reticulo-endothelial tissues and later there is an increase in the circulating leucocytes due to liberation of cells from the bone marrow (4)

In order to further elucidate the leukopenia of partial body irradiation, we have examined irradiated rats after injection of typhoid vaccine.

Material and Methods

Male rats (Hebrew University local strain) weighing 200–250 grams were fed ad libitum on water and food pellets. Partial body exposures were given at dose rate of 130 /minute at 200 KV (using filters of 0.5 mmCu and 1 0 mmAL). Animals exposed to localized irradiation were anaesthetized with 30 mg/kg intraperitoneal sodium pentobarbital. Total leucocyte counts were performed immediately before and on the 5th day after irradiation. On the 5th day one ml. typhoid vaccine (1000 millions S. typhi, 500 millions S. para typhi A and 500 millions S para typhi B.) was injected subcutaneously and leucocyte counts performed after 1 4 and 6 hours.

4 groups of rats received upper-body irradiation (from the xyphoid upwards) and 4 groups lower-body irradiation (caudally to the xyphoid) Each group contained 12 to 15 rats. The doses given to the respective groups were 250r 500, 750r and 1000r A control group of animals received typhoid vaccine but were not irradiated.

Results

The results are recorded in Fig 1 and 2 and Table I The non-irradiated control group showed a fall in the leucocyte count in the first hour after the injection of 1 ml of typhoid vaccine and then a gradual increase to above the pretreatment value.

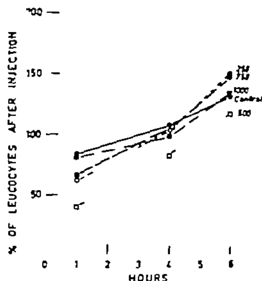


Fig 1 Effect of typhoid vaccine injection in upper body irradiated rats.

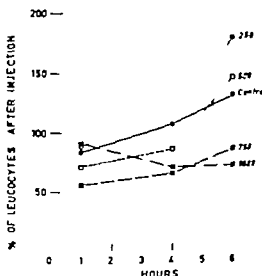


Fig Effect of typhoid vaccine injection in lower body irradiated rats.

In the upper-body irradiated groups, which received 250r 500r and 750r the one hour leucocyte counts were lower than in the control group The 6-hour rise in the cell count in these groups was not significantly different from that in the control animals. In the 1000r irradiated group the 1 4 and 6-hour counts were not

Table I

Leucocyte counts in irradiated and typhoid vaccine injected rats

Area of irradiation Dose	Lower body 250r	Upper body 250r	Lower body 500r	Upper body 500r	Lower body 750r	Upper body 750r	Lower body 1000r	Upper body 1000r	Control not irradiated
Pre-irradiation	100	100	100	100	100	100	100	100	
5 days after irradiation	63	63	45	78	46	65	44	52	100
1 h after typhoid vaccine injection	88	62	71	40*	56	66	91	82	84
4 h after typhoid vaccine injection	119	103	86	81	66	106	71	98	107
6 h after typhoid vaccine injection	179	149	146	116	88	148	72	133	131

percentage of 5th day count.

significantly different from the control. In the lower body irradiated group which received 250r the one hour count did not differ from the control, but the 6 hour increase was higher than in the control. In the 500r and 750r lower body irradiated groups there was a larger initial fall in the leucocyte count. In the 750r group there was a smaller subsequent rise in the number of the cells compared with the control. In the 1000r group the one hour count was similar to that in the control animals but the 6 hour count showed that the release of cells from the bone marrow was significantly depressed.

Discussion

In a previous communication we found that the antiglobulin consumption test becomes positive after partial body irradiation, although less strongly than after chemotherapy indicating that partial body irradiation damages the leucocytes (5) The present experiments show that the one hour leucocyte count was lower in the upper body than in the lower body irradiated groups. The 4 and 6 hour counts show that the release of leucocytes from the bone marrow was more depressed in the lower body than in upper body irradiated groups. The probable explanation of this is that irradiation damages both the intravascular leucocytes and the cells in the bone marrow Typhoid vaccine injection augments the sequestration of damaged cells in the reticulo-endothelial system in the first hour As the blood volume is larger in the upper than in the lower-body a lower one hour white cell count is seen in the upper body irradiated group The active bone marrow is mostly concentrated in the lower body and so the 4 and 6 hour counts,

which represent the release of cells from the bone marrow are lower in the lower body than in the upper body irradiated group. The 1 hour count in the groups which received 1000r was similar to that in the controls. This was probably due to the fact that this dose destroyed most of the cells so that the typhoid vaccine could not augment the sequestration of intravascular cells.

It is of interest that the 6 hour leucocyte count in the 250r lower body irradiated group was higher than the control. It is possible that this dose stimulates the bone marrow to release more cells.

Acknowledgements. We are grateful to Miss B. Davidson for technical assistance, and to Dr. Gerichter for the supply of the typhoid vaccine.

Summary

Typhoid vaccine was injected into partial body irradiated rats in an attempt to elucidate the mechanism of irradiation induced leukopenia. Upper body irradiation predominantly damages intravascular leucocytes. Lower body irradiation depresses the release of leucocytes from the bone marrow and also damages intravascular leucocytes, but to a lesser degree than upper-body irradiation.

Zusammenfassung

Um den Mechanismus der Bestrahlungsleukopenie aufzuklären, wurden Ratten nach partieller Körperbestrahlung Typhus-Vaccine injiziert. Bestrahlung der oberen Körperhälfte schädigt vor allem die intravaskulären Leukozyten. Bestrahlung der unteren Körperhälfte vermindert die Abgabe von Leukozyten aus dem Knochenmark. Sie schädigt auch die intravaskulären Leukozyten, jedoch in geringerem Grade als die Bestrahlung der oberen Körperhälfte.

Résumé

Dans le but d'élucider le mécanisme de la leucopénie par irradiation, nous avons injecté à des rats des vaccins anti-typhiques après irradiation partielle de l'organisme. L'irradiation de la partie supérieure de l'organisme endommage surtout les leucocytes intravasculaires. L'irradiation de la partie inférieure de l'organisme diminue la libération des leucocytes de la moelle osseuse et endommage aussi les leucocytes intravasculaires, cependant à un degré moindre que ne le fait l'irradiation de la partie supérieure de l'organisme.

References

1. Edelman, A.: New evidence for a toxic substance elaborated after irradiation. Fed. Proc. 14: 42 (1955).
2. Osgood, E. E.: Is the action of roentgen rays direct or indirect? Amer. J. Roentgenol. 49: 14 (194.).
3. Robinson, E. and Nelken, D.: The direct antiglobulin consumption test after radiotherapy and chemotherapy. Acta haemat. 30: 138–143 (1963).
4. Yoffey, J. M.; Makin, G. S.; Yates, A. K.; Davis, C. J. F.; Griffiths, D. A. and Waring, I. S.: The discharge of granulocytes from guinea pig marrow in response to intravenous T.A.B. vaccine. A quantitative study. Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 790–799 (1964).

Authors' address: Drs. E. Robinson and A. Hochman, Dept. of Oncology, Hadassah Univ. Hospital, Jerusalem (Israel).

Acta haemat. 34 305-320 (1965)

Department of Medicine (Dir Prof. J VANDENBROUCKE) The Laboratory of Blood Coagulation and Proteolysis (Dir Prof M. VERSTRAETE) University of Louvain

A Technique for Routine Evaluation of Plasminogen in Humans during Streptokinase Therapy

By R. A. DE VREKER

The blood level of plasminogen can adequately be used as a guiding parameter for streptokinase (SK) dosage in intravascular clot dissolution. This results from studies on artificially induced venous clots (10) as well as on spontaneous arterial occlusions (12) These studies stressed that the achievement of a marked fall in circulating plasminogen, below 10% of normal, is a prerequisite for attaining safe therapeutic conditions and the maintenance of this low level is associated with a high incidence of therapeutic success. Whether excessive plasminogen depletion, below 2% of normal, ought to be avoided is still debated. Plasminogen depletion is favourable for safe haemostasis, as plasmin formation and subsequent proteolysis of coagulation proteins is greatly decreased. If then, however rethrombosis occurred, the plasminogen-deficient thrombi would be resistant to SK. This drawback of depleting the blood plasminogen excessively during SK treatment has been demonstrated for artifical occlusions formed in damaged blood vessels (10) Thus, an assay method with sensitivity range below 10% of the normal human plasminogen level is to be used for dosage evaluation in SK therapy

During the *in vitro* reaction between SK and human plasminogen in diluted plasma two entities can form. Optimal formation of plasmin (E.C.3 4 4 14) occurs at low SK to human plasminogen ratios. At very high SK to plasminogen ratios essentially activator is formed this is an entity capable of converting human or other plasminogen into plasmin. Plasmin can be assayed directly by proteolysis or esterolysis measurements after optimum conversion

of the proenzyme into plasmin. However these methods lack the desired sensitivity as will be reported below Moreover the test sample has to be incorporated in the test system at a high concentration, where plasma inhibitors interfere. Preference is given to methods using maximal SK induced conversion of the human plasminogen into activator subsequently converting into plasmin bovine plasminogen, insensitive to SK. In standardized conditions, the rate of proteolysis of a sensitive substrate by the bovine plasmin, formed in the presence of an excess of both SK and bovine plasminogen, is a measure of the activator and, therefore, of the human plasminogen present in the testsystem. It is appropriate to the studied therapeutic condition to define a human plasminogen in terms of its ability to form SK induced activator as activator in the blood is important in intravascular clot lysis (13)

Bovine fraction I preparations constitute, after in situ conversion into fibrin, an accessible substrate and provide in addition the needed bovine plasminogen. With serial dilutions of the test sample, as the only variable, the times for reaching endpoints of clot lysis are inversely proportional to enzyme activity From this time vs. dilutions relation, linearized on a double logarithmic graph, the amount of test substance causing a lysis endpoint in 30 minutes is interpolated. A similar method was briefly introduced by CHRISTENSEN (5) and improved by JOHNSON AND TILLET (11). Lysis is recorded in terms of viscosity decrease, the endpoint being taken when airbubbles trapped in the fibrin clot spontaneously move into the meniscus. The performance details of a plasminogen assay method meeting the above requirements of sensitivity and standardization will be described.

Materials

Buffer solutions All pH measurements were performed with Radiometer equipment and combined long-stem electrode type GK 2201 B. The adjustment buffer was Sørensen phosphate solution standardized at 20°C against 0.05 M potassium acid phthalate of pH 4.00 Unless otherwise stated, all solutions and testsystems were made up in borate buffer of pH 7 and ionic strength (I) of nearly 0..., prepared by dissolving in 700 ml distilled water 11 1 g boric acid (H_3BO_3) 8.3 g sodium tetraborate ($Na_2B_4O_7$ $10\,H_2O$ and 9 0 g sodium chloride, adjusting the pH by addition of concentrated HCl and diluting to volume of 1000 ml. Buffer solutions of different ionic strength were prepared by varying the NaCl concentration only

Streptokinase Kabikinase (R) (Kabi AB, Stockholm) and "Streptokinase" (Merck, Sharp, and Dohme Research Laboratories, West Point) were used to make up streptokinase solutions whose concentrations are expressed in streptokinase units in comparison with a reference, standardized against the NIH streptokinase reference preparation

tentative' The 10–15% excess, which usually was titrated in 'Kabikinase (R)' batches over the value mentioned on the label, was not taken into account. When 'Streptokinase' (Merck, Sharp, and Dohme Research Laboratories) was used, the value appearing on the label was multiplied by 2/3 to be compared with the NIH standard All solutions were kept in plastic tubes on ice or if not used within 4 h, stored at −20°C.

Bovine fibrinogen. Lyophilized bovine fibrinogen preparations of three different commercial sources were mainly used. Bovine fibrinogen lyophilized powder batch 57 (Poviet Produkten, Amsterdam) is referred to as Fibrinogen Poviet. Bovine fibrinogen Fraction I from bovine plasma, batch HB 227 (Armour Pharmaceutical Company Ltd., Eastbourne) is referred to as Fibrinogen Armour Finally bovine fibrinogen batch 703 B (Behringwerke AG, Marburg) is referred to as Fibrinogen Behring

The material necessary (see below) for 10 ml solution was weighed out, dissolved in 2 ml buffer at 37°C with occasional shaking, diluted, and kept t room temperature. Under these conditions, solutions of both Fibrinogen Poviet and Behring remain stable for use over one day The stability of Fibrinogen Armour extends only over 4 h but may adequately be prolonged if the solution is kept at 0°C. Fibrinogen Poviet solutions, however, if kept in the cold, rapidly change their properties owing to cryoprecipitate formation. Fibrinogen Armour is by far most easy to dissolve. The coagulability of these solutions on both protein and a dry weight base has been determined on several occasions by the urea method of BLOMBÄCK AND BLOMBÄCK (4). The coagulability ver aged 77% for Fibrinogen Poviet, 85% for Fibrinogen Armour and 94 for Fibrinogen Behring. The recovery of clottable fibrinogen in solution, with respect to the dry powder averaged 52% in the case of Fibrinogen Poviet, 48% for Fibrinogen Armour and 73% for Fibrinogen Behring

In some instances bovine fractions I–4 (4), 98–93% coagulable, and I–4 E (2), 95% coagulable and plasminogen-free, were used after thawing and diluting with an appropriate buffer-Na Cl mixture to desired protein concentration.

Fibrinogen concentrations in the text refer to the amount of lyophilized material (commercial) or total protein (home-made) introduced in the system, not taking into account clottability or recovery figures.

Thrombin (E.C. 3.4.4.13) Mainly lyophilized bovine thrombin, containing around 130 NIH units per mg, was used. Two commercial preparations, Topostasin (R) (F HOFFMANN-LA ROCHE, Basel) and Thrombin Topical (PARKE, DAVIS & Co., Detroit) though less potent, were found as effective as the homemade preparation. The material was dissolved to proper strength and kept in plastic tubes on ice or stored at −20°C. For routine work, it was found more convenient to dissolve the material t 80 NIH units/ml concentration in 50% (vol./vol.) glycerol in 0.1 M sodium acetate pH 5.5. This stock solution remained stable for months at +2°C and was diluted prior to use with 3 volumes of borate buffer

Bovine plasminogen. For studying the effect of bovine plasminogen concentration in the proposed technique, freeze-dried fraction B 2, 3 (1) was dissolved in borate buffer and incorporated in bovine fibrinogen fraction I–4 E.

Plasma samples were obtained by cold centrifugation from blood (9.8 ml) collected on 16% sodium citrate dihydrate (0.2 ml) and used t once or stored at −20°C. "Normal" plasma pools were constituted by mixing plasma samples from at least 10 bloodbank donors.

All chemicals used were of AR grade unless otherwise state.

Methods

Proposed assay method (routine performance) A twofold dilution series of plasma is set up in number of 0.8 × 11 cm glass tubes in melting ice and containing measured

Personal communication by Dr MERRY and checked in our laboratory

amounts of cold borate buffer T the first tube, containing 2 ml of buffer is added 0.2 ml of chilled plasma. From this mixed solution 1 ml is transferred to the second tube containing 1 ml of buffer the pipet is blown-out in a piece of absorbing paper and used for mixing the solution by repeated aspiration. Subsequently progressi 1 ml dilutions are similarly transferred to each next tube containing 1 ml buffer For normal plasma samples 8 to 10 similar successive dilution steps are made. Thus the plasma dilution in the tubes is respectively 1 11 1 22 1 44 etc. Starting with the lowest concentration 0.2 ml portions are immediately transferred to chilled empty 0.8 × 11 cm testtubes. As the clots will have a final volume of 1 ml, they will constitut a plasma dilution series of 1 55, 1 110 1:220, etc. T each 0.2 ml portion is added 0.2 ml chilled streptokinase solution, containing 8000 units SK per ml of borate buffer and 0.5 ml of bovine fibrinogen solution of proper concentration made-up in borate buffer T each single tube is added 0.1 ml of thrombin solution containing 20 NIH units/ml. The tube is taken out of the melting ice and swirled during 10 sec at high frequency in mixing-machine (Supermixer Lab-Line Instruments, Inc. or Vortex Mixer Scientific Industries, Inc.) This results both in adequate mixing and maximal air incorporation in the solution. The tube is then put at once in a 37°C transparent waterbath, when stopwatch is started. The thrombin addition and mixing are repeated for the next tubes so as to start their incubation at 30 sec intervals, as indicated by the stopwatch. During the warming-up of the incubate, gas solubility decreases, resulting into airbubble formation and trapping in the solid clot. As clot lysis proceeds parallel with viscosity decrease, airbubble trapping ceases when an ppropriate state of liquefaction is attained. Lysis endpoint time is read from the stopwatch t the moment the bulk of the rising airbubbles attains the meniscus. Tubes are continuously inspected or t least, every 30 sec, between the tenth and the fortieth min of the incubation time. As airbubbles may adhere to the glass or to isolated fibrin fibres, often formed when thrombin addition and mixing are performed too roughly the tubes, which are t about lysis endpoint, are flicked every 30 sec. The recorded times are corrected for delay t the start and plotted on a double-logarithmic graph versus the reciprocal of the plasma dilution in the considered tube. The plasminogen level of the analysed plasma is read from the 30 minute intercept on the best fitting straight line joining the experimental points (Fig. 1). When a lowered plasminogen level is to be expected in the testsample, as it occurs during streptokinase administration, less number of dilutions is needed or a lower dilution factor is selected. Instead of this time-consuming and approximate serial dilution, constant microlitre amounts of plasma may be pipetted with Levy-Lang constriction pipets into variable volumes of chilled buffer

Caseinolytic method. Plasminogen in human plasma was assayed as plasmin formed in the presence of optimal amounts of SK (6) Human plasma (50 µl) is incubated at 37°C and pH 7.4 in 2.45 ml Na phosphate 0.1 M-NaCl 0.15 M (70:30) containing 1.6% (w/vol.) casein (white soluble casein, British Drug Houses Ltd., acid precipitated and degreased by ether and ethanol extraction) and 75 units SK. Digestions are interrupted after 5 min (blank) and 65 min by adding 2.5 ml of redistilled trichloroacetic acid 10% (w/vol.). After standing for 1 hour t room temperature, the precipitate is spun down by centrifugation and the supernatants are collected by filtration through Schleicher & Schüll paper no. 595. The solubilized peptides are assayed in the Auto-Analyzer (R) by the Lowry method in comparison to bovine serumalbumin standards. The results are expressed as serumalbumin values, after substraction of the blank reading (6)

Esterolytic method. Plasminogen in human plasma was assayed as esterase formed in the presence of optimal amounts of SK (6) Human plasma (1.0 µl) is incubated at 37°C and pH 8.5 with 2.85 ml TRIS 0.33 M N Cl 0.15 M (1:1) containing 13.3 mM p-toluene sulphonyl arginine methyl ester HCl (H. M. Chemical Co., Ltd Santa Monica, Calif.) and 5000 units SK. Hydrolyses are interrupted after 5 min (blank) and 65 min by

adding 1 ml of redistilled trichloroacetic acid 15% (w/vol.). The precipitates are spun down by centrifugation and the supernatants are assayed for residual ester by the Hestrin (7) procedure in the Auto-Analyzer (R) (6). The results are expressed as micromoles of ester hydrolysed during 60 min in the test.

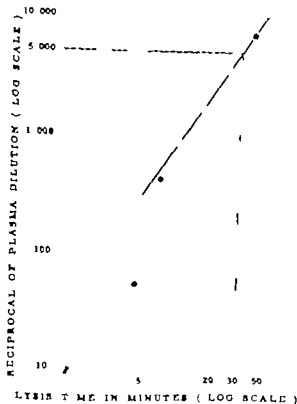


Fig. 1 Double logarithmic plot of lysis times in minutes against reciprocals of plasma dilution. Conditions in this experiment are 'normal' pooled human plasma, 37°C, borate buffer of pH 7.5 and I = 0.2, and, per ml clot, 1600 units SK, 5.0 mg fibrinogen Poviet and 2 units of thrombin

Results

Influence of Assay Conditions on the Sensitivity of the Method

Several variables pertaining to the bovine clot lysis assay and to the test system were investigated. By interpolation from a double logarithmic plot of lysis times versus reciprocals of corresponding plasma dilutions, the normal human plasma dilutions inducing a 30 minute lysis time were determined. If the extent of these dilu

tions increased or decreased, it was concluded that the technique had become more or less sensitive. All parameters of the assay system except for one variable were kept constant.

When thrombin concentration in the clot is varied between 1 and 20 units per ml, the coefficient of variation of the plasma dilution value causing a 30 minutes lysis time is under 0.05. This value is what is to be expected from the fidelity of the assay itself. If thrombin concentrations below one unit per ml clot are used, no firm clot is obtained and assay values are erratic. The influence of streptokinase concentration in the clot was studied in the range of 100 to 6400 units per ml. The results reported in Fig. 2 show an optimal concentration starting from 1600 units per ml clot on.

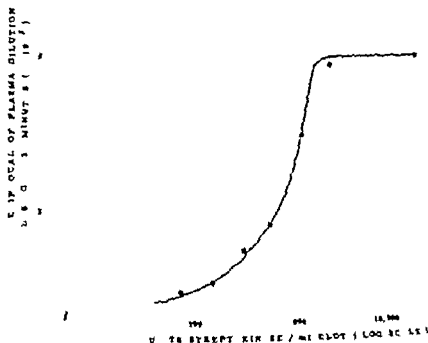


Fig. 2 Influence of streptokinase concentration on the sensitivity of the assay

The influence of the plasminogen, insensitive to streptokinase was investigated by enriching the clot prior to its formation, in bovine plasminogen. No effect was noted when plasminogen-containing bovine fibrinogen was used. This applies to the commercial fibrinogen preparations used as well as to fraction I 4 However

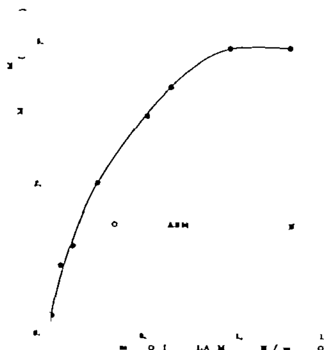


Fig. 3. Influence of bovine plasminogen concentration on the sensitivity of the assay. Prior to clotting, plasminogen-free bovine fibrinogen (fraction I 4 E) is enriched with variable amounts of purified bovine plasminogen (fraction B 2, 3).

when plasminogen-free bovine fibrinogen fraction I 4 E was enriched with bovine plasminogen fraction B 2 3 as shown in Fig 3 the sensitivity increased from virtually 0 i.e. stability of the clot over 8 h, to a value identical to those obtained with plasminogen containing bovine fibrinogen of the original fraction I 4 batch.

The effect of temperature on the sensitivity of the assay is shown in Fig 4 An optimum is observed between 35 and 37°C. It may be mentioned that, above the latter temperature, straight double logarithmic plots are no longer obtained. The slope of the curves diminishes when lysis times increase. The effect of the borate buffer pH is summarized in Table I.

An increase of sensitivity is observed for decreasing pH values of the borate buffer The effect of the ionic strength was studied by varying the NaCl concentration only The results reported in Table II show a sensitivity increase for decreasing ionic strength.

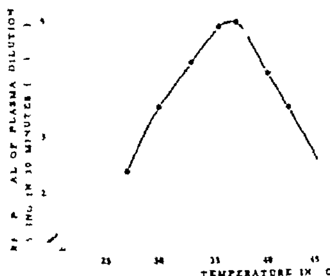


Fig. 4 Influence of temperature during incubation on the sensitivity of the assay

Table I

Effect of pH of the borate buffer on the sensitivity of the assay. Conditions are: borate buffer of I = 0.2, temperature of 37°C, 1600 units SK, 5.0 mg fibrinogen Poviet and 2 units thrombin per ml clot.

pH	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
7.2	6000
7.3	5700
7.4	5400
7.5	5000
7.6	4500
7.7	3300
7.8	2900

Table II

Effect of the ionic strength (I) on the sensitivity of the assay (mean values of triplicate assays). Conditions are: per ml clot 1600 units SK, 8.5 mg fibrinogen Armour and 2 units thrombin, temperature of 37°C and borate buffer of pH 7.5 and I = 0.045 adjusted to proper ionic strength by addition of NaCl.

Ionic strength	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
0.04	5700
0.09	5300
0.15	[illegible]
0.19	5100
0.24	1900
0.34	1000

It should be mentioned that, below I values of 0.2, fibrinogen solutions tend to become unstable as evidenced by increasing turbidity upon standing while at I values above 0.2 spontaneous air bubbel formation in the clot is greatly reduced.

When the bovine fibrinogen concentration is gradually increased in the test clot, the sensitivity of the assay decreases. It was investigated whether the Michaelis-Menten equation is applicable to this substrate dependence. Only a partial state of substrate proteolysis is attained at the viscosimetric endpoint for lysis time evaluation. Therefore the velocity value, calculated by dividing the fibrinogen concentration in the considered clot by the lysis time caused by a same human plasma dilution, was taken as an expression of the initial velocity. Thus the ratio of initial velocity over substrate concentration is given here by the reciprocal of the lysis times. The plot according to HOFSTEE (8) of the reaction velocities against the reciprocal of the lysis times yields a straight line as shown in Fig. 5.

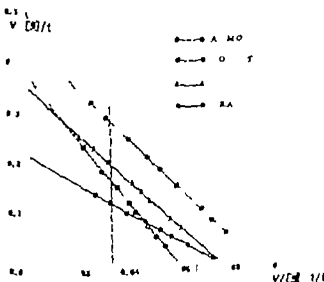


Fig. 5. Linear plot according to HOFSTEE (8) of reaction velocity (fibrinogen concentration divided by the lysis time) against reaction velocity divided by the fibrinogen concentration (reciprocal of the lysis time). Each one ml clot contains 2×10^{-4} ml human plasma, i.e. 5000 fold dilution. From the intercepts with the Y and X axes respectively are read the maximal velocity (Vmax) and maximal velocity divided by the Michaelis constant (Vmax/Km). From the intercept with the dotted vertical line, intersecting the X-axis at the reciprocal of 30 minutes, the velocity value is read which corresponds to lysis time of 30 minutes.

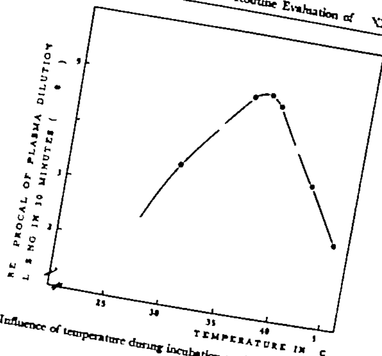


Fig 4 Influence of temperature during incubation on the sensitivity of the assay

Table I

Effect of pH of the borate buffer on the sensitivity of the assay Conditions are borate buffer of I = 0.2, temperature of 37°C, 1600 units SK, 5.0 mg fibrinogen Poviet and 2 units thrombin per ml clot.

pH	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
7.2	6000
7.3	5700
7.4	5400
7.5	5000
7.6	4500
7.7	3300
7.8	2900

Table II

Effect of the ionic strength (I) on the sensitivity of the assay (mean values of trip..cate assays Conditions are per ml clot 1600 units SK, 8.5 mg fibrinogen Armour and 2 units thrombin temperature of 37°C and borate buffer of pH 7.5 and I = 0.043 adjusted to proper ionic strength by addition of NaCl.

Ionic strength	Reciprocal of plasma dilution causing lysis in 30 min
0.04	5700
0.09_5	5500
0.15	5300
0.19	5100
0.24	1900
0.34	1000

It should be mentioned that, below I values of 0.2 fibrinogen solutions tend to become unstable as evidenced by increasing turbidity upon standing while at I values above 0.2 spontaneous air bubbel formation in the clot is greatly reduced.

When the bovine fibrinogen concentration is gradually increased in the test clot, the sensitivity of the assay decreases. It was investigated whether the Michaelis-Menten equation is applicable to this substrate dependence. Only a partial state of substrate proteolysis is attained at the viscosimetric endpoint for lysis time evaluation. Therefore the velocity value, calculated by dividing the fibrinogen concentration in the considered clot by the lysis time caused by a same human plasma dilution, was taken as an expression of the initial velocity Thus the ratio of initial velocity over substrate concentration is given here by the reciprocal of the lysis times. The plot according to Hofstee (8) of the reaction velocities against the reciprocal of the lysis times yields a straight line, as shown in Fig 5

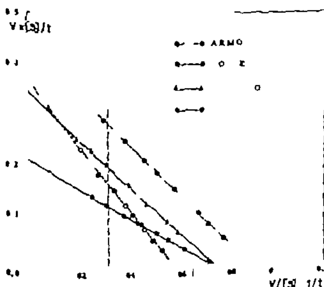


Fig. 5 *Linear plot* according to Hofstee (8) of reaction velocity (fibrinogen concentration divided by the lysis time) against reaction velocity divided by the fibrinogen concentration (reciprocal of the lysis time). Each one ml clot contains 2×10^{-4} ml human plasma, i.e. 5000 fold dilution. From the intercepts with the Y and X axes respectively are read the maximal velocity (Vmax) and maximal velocity divided by the Michaelis constant (Vmax/Km). From the intercept with the dotted vertical line, intersecting the X-axis at the reciprocal of 30 minutes, the velocity value is read which corresponds to lysis time of 30 minutes.

of the caseinolytic and esterolytic assays is only down to 5 % of the normal human plasminogen level. The fidelity of the assays can be deduced from the average deviations from the mean of each result.

Table II

Comparison of the proposed assay to caseinolytic assays with respect to sensitivity

Normal plasma in the test	Proposed assay Plasminogen units	Caseinolytic [illegible] values (60 min digestion)	Esterolytic µM ester hydrolysed 60 min⁻¹
Undiluted	5000 ± 200	296 ± 2	23.7 ± 0.2
50%	2500 ± 100	142 ± 2	11.8 ± 0.2
10%	500 ± 30	28 ± 3	1.8 ± 0.2
5 %	100 ± 10	15 ± 3	0.7 ± 0.3
1%	50 ± 10	0	0
0.5	25 ± 5	0	0

With respect to this property the proposed assay only behaves favourably at low plasminogen levels.

Discussion

The assay of human plasminogen in the described system, based on a two step reaction sequence, exhibits two major advantages. The required equipment and the reagents are easily available and generally present in a blood coagulation laboratory or in a unit dealing with fibrinolytic experimentation. The sensitivity is very high and allows quantitation of human plasminogen concentrations below 0.5 % of the normal level. From comparisons with caseinolytic and esterolytic assays it appears that the bovine clot lysis system is to be preferred for low proenzyme levels while the chemical techniques result into more sensitivity and fidelity at levels around the normal range. It should be mentioned that the extensive dilution of the test plasma rules out possible interference by plasma fibrinolytic inhibitors.

Several parameters pertaining to the assay and to the test system have been investigated. The thrombin, the streptokinase and the bovine plasminogen concentrations are not critical as far as they are incorporated in sufficient amounts. According to the results reported in figure 2, 1600 units of SK are incorporated in

a test clot containing about 2 10^{-4} ml of normal plasma. Thus it may be calculated that an amount of SK of the order of 8 megaunits is used for activating 1 ml of normal plasma. When using 50 times less SK, as proposed by BLIX (3) the clot lysis assay was found unsatisfactory Caseinolytic experiments showed that maximal in vitro formation of activator in normal human plasma only occurs when at least 4 megaunits of SK are present per ml of plasma (6) The pH value, the ionic strength, the temperature, and the bovine fibrinogen concentration, however are critical. A pH value of 7.5 is selected so as to match with sensitivity and buffer properties. The buffer nature has not been dealed with in the present study Other buffers could be used but would lead to other assay conditions. An ionic strength of 0.2 is selected, which matches with sensitivity ease of performance, and solubility of the bovine fibrinogen. The 37 C temperature is selected in an optimum sensitivity zone and preferred as it is the working temperature in many blood coagulation and fibrinolysis tests. The concentration of bovine fibrinogen, acting as precursor of both the substrate (fibrin) and of the final enzyme (plasmin) has been selected as the unique variable for controlling the standardization of the assay Indeed the sensitivity is inversely proportional to the fibrinogen concentration. Hence the bovine fibrinogen in the test was selected so that one unit of human plasminogen, maximally activated with SK, would cause the test clot to lyse in exactly 30 min. To normal human plasma was assigned a plasminogen content of 5000 units per ml.

From the data on the relation between bovine fibrinogen concentration to sensitivity an obedience to the Michaelis-Menten equation was observed. This applies if fibrinogen concentration is taken for substrate concentration. Such finding primarily corroborates the non-critical influence of the bovine plasminogen in the test. It may also be concluded that the clot lysis assay follows a simple kinetic law This implies that the viscosimetric lysis endpoint only corresponds to a partial proteolysis state of the fibrin substrate. The same relation leads to the evaluation of kinetic constants among which the Michaelis constant and maximal velocity were calculated for a few fibrinogen preparations. Finally the desired fibrinogen concentration for particular batches may be easily computed from these constants or interpolated from linearized plots.

Both highly purified and commercial bovine fibrinogens are suitable substrates. Fraction I 4 is preferred for stability upon

keeping and ease of handling. Commercial preparations however are more easily obtainable in every laboratory, but do not possess the above mentioned advantages. Ultimate care should be taken that the reagent be adequately and reproducibly dissolved. This applies especially for fibrinogen Behring, while the dissolution of fibrinogen Armour causes no problem. The stability of the solutions is a limiting factor to their keeping qualities. Fibrinogen Behring is the most stable, while both the Armour and Poviet products deteriorate within 4 hours. Besides, the latter precipitates rapidly if kept at low temperature. No commercial preparation was found suitable for large batch dissolution to proper strength and keeping in the frozen state, as is routinely done with bovine fraction I-4. Bovine plasma, which might have been convenient (3) and easily obtainable, had to be disregarded because, to personal experience, its sensitivity in the test decreases progressively during storage, even in the frozen state. Finally it should be pointed out that the proposed assay technique has been used on many occasions for following the plasminogen level during SK therapy in humans (13). A SK administration scheme could with success be based on these plasminogen figures (12). The high incidence of thrombolytic success obtained with this scheme is an indirect proof of the clinical usefulness of the described plasminogen assay method.

Acknowledgments. The author is much indebted to Arlette Vermaelen and Frans Peeters for skilful assistance. Helpful discussions with Dr. Alan J. Johnson of New York University are gratefully acknowledged. Kabikinase (R) has been supplied to the laboratory in liberal amounts by AB KABI, Stockholm, through Messrs A. Christiaens S. A., Brussel. This investigation has been aided by the Fonds voor Wetenschappelijk Geneeskundig Onderzoek, through grants to Profs J. Vandenbroucke and M. Verstraete.

Summary

The performance details are described of a technique for routine evaluation of plasminogen in humans. In a Christensen clot lysis type of assay, the human plasminogen is converted into activator which transforms bovine plasminogen into plasmin. The parameters pertaining to the reagents and conditions of the assay are investigated. Kinetic data has been obtained concerning fibrin clot dissolution induced by activated human plasminogen. A standardization of the assay is presented based on an assumed plasminogen content in normal plasma of 5000 units per ml and on the obedience of the kinetics to the Michaelis-Menten equation. The sensitivity and fidelity of the described technique and of caseinolytic and esterolytic assays are compared. The technique has been routinely and satisfactorily applied during thrombolytic experiments in humans with streptokinase.

Résumé

Une méthode pour la détermination de routine d taux de plasminogène chez l'homme est décrite en détails. Dans une épreuve de lyse du caillot selon CHRISTENSEN le plasminogène humain est converti en un activateur qui transforme le plasminogène bovin en plasmine. L'influence des réactifs et des conditions expérimentales sont étudiées. Des données cinétiques ont été obtenues concernant la dissolution du caillot de fibrine, dissolution induite par du plasminogène humain activé. Une standardisation de l'épreuve est présentée qui est basée sur un taux plasmatique présumé être de .000 unités par ml dans le plasma normal et sur la supposition que la cinétique de l'épreuve suit l'équation de MICHAELIS-MENTEN. La sensibilité et la sûreté de l'épreuve sont comparées à celles des méthodes de caséinolyse et d'estérolyse. La méthode été employée avec succès dans des essais de thrombolyse effectués chez l'homme à l'aide de streptokinase.

Zusammenfassung

Es werden die methodischen Details eines Verfahrens zur Routinebestimmung von Plasminogen beim Menschen beschrieben. Nach Art der Bestimmung der Gerinnselauflösung nach CHRISTENSEN wird menschliches Plasminogen in den Aktivator übergeführt, der bovines Plasminogen in Plasmin umwandelt. Die Einflüsse der Reagentien und der Versuchsbedingungen wurden analysiert. Über die Auflösung von Fibringerinnseln durch aktiviertes menschliches Plasminogen wurden kinetische Daten ermittelt. Es wird eine Standardisierung des Verfahrens angegeben unter der Annahme eines Plasminogengehaltes in normalem Plasma von 5000 Einheiten und unter der Voraussetzung, daß die Kinetik nach der Gleichung von *Michaelis-Menten* erfolgt. Die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens werden verglichen mit denjenigen der kaseinolytischen und der esterolytischen Methoden. Bei thrombolytischen Versuchen mit Streptokinase am Menschen wurde das Verfahren routinemäßig und mit gutem Erfolg angewendet.

References

1. BERGSTRÖM, K. Purification of bovine plasminogen. Arkiv Kemi *21* 517 554 (1963)
2. BERGSTRÖM, K. AND WALLÉN, P. Removal of contaminating plasminogen from purified bovine fibrinogen. Arkiv Kemi *17* 503–511 (1961)
3. BLIX, S.: The proactivator of the fibrinolytic system in human plasma. The quantitative determination and its clinical application. Acta med. scand. *171* 93–98 (1962).
4. BLOMBÄCK, B. AND BLOMBÄCK, M. Purification of human and bovine fibrinogen. Arkiv Kemi *10* 415–443 (1956).
5. CHRISTENSEN, L. R. Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system, and streptococcal desoxyribonuclease. J. clin. Invest. *28* 163–172 (1949).
6. DE VRIES, R. A. Assay of parameters related to plasminogen activation. Xth Congr. Int. Soc. Haemat., Stockholm 1964 — Assay of fibrinolytic parameters by semiautomatic techniques. Automation in der analytischen Chemie. Int. Technicon Symp., Frankfurt a. Main 1964. 523–529.
7. HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical applications. J. biol. Chem. *180*: 249–261 (1949).

8. Hofstee, B. H. J : Graphical analysis of single enzyme systems. Enzymologia 17 273-278 (1956)

9. Johnson, A. J : (pers. commun. 1965)

10. Johnson, A. J and McCarty W. R. The lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of streptokinase J clin. Invest. 38. 1627 1643 (1959)

11 Johnson, A. J and Tillett W. S.: The lysis in rabbits of intravascular blood clots by the streptococcal fibrinolytic system (Streptokinase) J exp. Med. 95. 449-464 (1952)

12. Verstraete, M.; Amery A.; Vermylen, J Vermylen, C. and de Vreker, R. A. Practical method for thrombolytic treatment with streptokinase. Maintenance of nearly complete plasminogen depletion associated with high circulating activator activity Brit. med. J 675-676 (1964)

13 Verstraete, M Vermylen, J ; de Vreker, R.; Amery A. and Vermylen C. Efficacy of thrombolytic therapy with streptokinase using a new administration scheme Scand. J clin. Lab. Invest. 16, Suppl. 78. 15-22 (1964).

Author address Dr R. A. De Vreker The Laboratory of Blood Coagulation and Proteolysis, Kapucijnenvoer 35, Leuven (Belgium).

Acta haemat. 34 321 328 (1965)

Department of Clinical Medicine of the University of Pavia
(Dir Prof. P Introzzi)

Chloramphenicol and Erythropoiesis

E. G Rondanelli, P Gorini and E. Magliulo

The development of an irreversible and fatal aplastic anaemia was reported by some authors (15 11) following chloramphenicol administration. However a mild and reversible bone marrow depression seems to occur more frequently (14 3 10, 6, 11 12) Generally excessive doses had been employed, and for prolonged periods of time.

In order to investigate the effect of chloramphenicol on erythropoiesis, studies were carried out on the maturation and proliferation of human and animal erythropoietic cells. Care was taken to employ doses or concentrations of the drug not exceeding those normally found in clinical practice

Materials and Methods

Studies on human subjects. Bone-marrow samples were obtained by sternal puncture from 4 healthy subjects receiving chloramphenicol (Chemicetina Erba) t daily dose of 2 grams during 1 week, and from other 4 subjects who did not receive any treatment before the experiment. With part of bone-marrow particles slides were prepared, which were stained with May-Grunwald-Giemsa. Mitotic indices were determined on the slides by counting the number of mitoses/1000 cells in basophil (proerythroblasts included), polychromatophil and total erythroblasts. At least 4000 cells were counted for every subject. The remaining samples of bone-marrow were cultured in liquid medium for maturation studies (4 cultures for every subject) and in plasma clot for proliferation studies, (also 4 cultures for every subject) according to the methods developed by Astaldi et al. (1 2). Maturation in vitro was studied by observing the rate of disappearance of more immature cells in the medium, i. the relative frequency of cells in every maturation stage at several hours after the onset of the culture. Proliferation was studied by the colchicine stathmokinetic method of Astaldi, by counting mitotic blocks/1000 cells during period of 12 hours (1).

Studies on the chronology of mitosis in tritons' erythropoietic cells in vitro. Slide cultures in Leighton tubes were prepared with spleen fragments from Tritons (Molge Vulgaris L.) according to the method of Rondanelli et al. (1961). When suitable growth was obtained the medium was substituted with fresh medium containing 60γ/cc of Chloramphenicol. After 12 hours the duration of mitosis and its phases was measured under

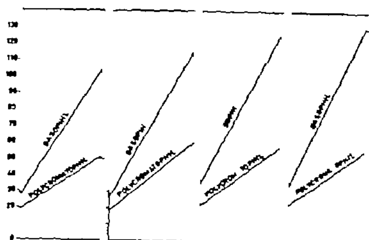


Fig. 3. Stathmokinetic indices. a) Erythroblasts from treated subjects in autologous plasma. b) Erythroblasts from treated subjects in plasma of untreated subjects. c) Erythroblasts from untreated subjects in plasma of treated subjects. d) Controls.

that this was based on excess estimates of maturation times and these were obtained by averaging more data. In effect the disappearance time of erythroblasts in some cultures fell within normal limits, which makes the maturative slowing-down not systemic.

2. *Proliferation* (Tables I and II Fig 2 and 3) The average mitotic indices of basophil, polychromatophil and total erythroblasts in treated subjects appear lower than in the controls (Table I) The incidence (every 100 mitoses) of metaphase is slightly higher after chloramphenicol (Fig 2) The average stathmokinetic index (Table II und Fig 3) of basophil erythroblasts (including proerythroblasts) is lower in marrow from treated patients when cultured in autologous plasma. When cultured in normal plasma, basophil erythroblasts do not display any decrease in stathmokinetic index, as well as erythroblasts from untreated subjects cultured in plasma from treated patients. The average stathmokinetic index of polychromatophil erythroblasts from treated subjects is lower than normal only in autologous plasma. The statistical analysis of proliferation data in humans yelded the following results

a) Comparison between mitotic indices in
   Total erythroblasts Student's t = 0.97 ($P > 0.05$)
   Basophil erythroblasts Student's t = 1 77 ($P > 0 05$)
   Polychromatophil erythroblasts Student's t = 0 49 ($P > 0.05$)

b) Comparison between stathmokinetic indices
Basophil erythroblasts Student s t = 1.91 (P> 0 05)
Polychromatophil erythroblasts Student s t = 0 06 (P> 0 05)

c) Comparison between metaphase incidences (every 100 mitoses)
Basophil erythroblasts χ^2 = 1.96 (P> 0 05)
Polychromatophil erythroblasts χ^2 = 2 84 (P> 0 05)

The statistical analysis then shows that differences observed in mitotic and stathmokinetic indices, and in metaphase incidence between treated and untreated subjects are not statistically significant.

Studies on the Chronology of Mitosis in Triton Tissue Cultures

In triton erythroblasts treated with 60 γ/ml of chloramphenicol mitosis lasts longer than in the control (Tables III–VI) The increase in duration of mitosis in more marked in basophil than in polychromatophil erythroblasts and appears in dependence of an increased duration of metaphase and, at a lesser degree, of ana telophase. No morphological anomalies of the course of mitosis were observed. The statistical analysis yielded the following results
Comparison between basophil erythroblasts Student's t
= 2.06 (P> 0 05)
Comparison between polychromatophil erythroblasts Student s t
= 1.26 (P> 0 05)

The difference observed are thus not statistically significative.

Table III
Duration of mitosis and its phases in untreated triton basophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	12′ 46″	59′ 48″	15′ 10″	18′ 49″	104′ 33″
II	20′ 03″	49′ 11	16′ 30″	13′ 05	98′ 49″
III	28′ 02″	63′ 01	20′ 08″	14′ 58″	126′ 09″
IV	24 48″	59′ 12″	17′ 18″	16′ 10″	117′ 28″
V	18′ 07″	52′ 24	18′ 18″	19′ 21	108′ 10″
VI	19′ 35	41 03″	18′ 02″	15′ 08″	113′ 48″
VII	32′ 12″	56′ 36″	19′ 26	18′ 07″	126′ 21
VIII	24 52″	72′ 01	16′ 17″	14 37″	127′ 47″
IX	24 51	50′ 01	15 31	20′ 43	111 08″
X	22′ 04″	58′ 13″	16′ 40″	11 20″	108′ 17″
Average	22′ 44	58′ 09″	17′ 08″	16′ 14	114′ 15

Table IV

Duration of mitosis and its phases in untreated triton polychromatophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	20′ 50″	64 22″	26′ 02″	21 24	152′ 38″
II	21 52″	69′ 23″	23 48″	19′ 38″	136′ 39″
III	18′ 07″	73′ 34	20′ 22″	19′ 16	131 19″
IV	30′ 14	82′ 21	22′ 30″	18′ 13″	153′ 20″
V	32′ 11	78′ 23	23′ 27″	16′ 16″	150′ 19″
VI	26′ 33″	74 47	22′ 38″	19′ 22″	143′ 40″
VII	24 02″	81 08″	24 49″	23′ 07″	153′ 06″
VIII	26′ 51	79′ 03	24 01	18′ 09″	148′ 04″
IX	29′ 48″	80′ 14	33′ 04	17′ 33″	149′ 39″
X	24 42″	78′ 33″	18′ 19″	15 02″	136′ 36″
Average	25 33	76′ 11	23′ 00″	18′ 30″	143′ 34

Table V

Duration of mitosis and its phases in treated triton basophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	13′ 01	64 43	18′ 26	22′ 10″	118′ 22″
II	18′ 36	68′ 49″	19′ 02″	17′ 38″	124′ 45″
III	13′ 13	58′ 20″	20′ 08″	23′ 08″	114′ 49″
IV	22′ 11	61 31	22′ 05	19′ 37″	125′ 24
V	30′ 04	77′ 08	19′ 38″	24 51	151 39″
VI	18′ 10″	63′ 02″	15′ 31	16′ 20″	115′ 03″
VII	22′ 15″	53 53	20′ 27″	18′ 50″	117′ 27″
VIII	22′ 41	66′ 13″	13′ 46	16′ 10″	118′ 39″
IX	24 07″	61 11	15 47″	20′ 29″	121 34″
X	25 12″	74 48″	18′ 20″	19′ 27″	137′ 47″
Average	20′ 59″	63 10″	18′ 21	19′ 34	124′ 24

Table VI

Duration of mitosis and its phases in treated triton polychromatophil erythroblasts.

Mitosis Nr	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Total
I	24 38″	81 02″	28′ 01	21 42″	133 23″
II	26 36	82′ 19″	23 49″	24 31	157′ 33
III	26′ 22″	79′ 33	23 02″	26 53″	157′ 30″
IV	30′ 21	78′ 42″	18′ 38″	18′ 03″	146 04
V	21 11	72′ 48″	28′ 20″	19′ 08″	141 27″
VI	23 47″	84 13	27′ 23	21 21	158′ 46″
VII	22′ 49″	78′ 00″	30′ 13	27′ 34	158′ 36″
VIII	24 09″	73 53″	18′ 07″	17′ 35	133′ 44
IX	18′ 59″	67 16	17′ 21	21 07″	124′ 43″
X	30′ 38″	88′ 04	21 24	22′ 26″	162′ 32″
Average	25 03″	78′ 33	23 52″	22′ 04″	149′ 40″

Discussion

Not many reports have been published on the action of chloramphenicol on human and animal cells. FUSILLO *et al.* (9) and POMERAT AND LEAKE (13) reported that tissue cultures are resistant to even high concentrations of chloramphenicol. Inhibition of respiration of leukocytes *in vitro* (8) inhibition of DNA and RNA synthesis in isolated thymic nuclei (5) and in bone marrow cells in vitro (16) and suppression of iron uptake and utilization in bone-marrow-cells *in vitro* (7) have been reported for drug levels which however are far above the usual therapeutic range (not exceeding 40γ/ml) The studies presented here indicate that chloramphenicol when acting on red cell precursors in quantities and within times compatible with its therapeutic effectiveness, does not induce changes of maturation and proliferation potentials which could involve significative relations between the drug and erythropoietic suppression.

Summary

In order to investigate the effect of chloramphenicol on erythropoiesis, studies were carried out on the maturation and proliferation of human and animal erythropoietic cells. The results indicate that chloramphenicol, when administered for not prolonged periods of time at doses not exceeding those therapeutically effective, does not cause significative alterations of maturation and proliferation of erythropoietic cells.

Résumé

Afin d'élucider les effets du chloramphénicol sur l'érythropoïèse, nous avons étudié la maturation et la prolifération de cellules érythropoïétiques humaines et animales. Les résultats démontrent que le chloramphénicol ne provoque pas d'altération significative de la maturation et de la prolifération des cellules érythropoïétiques s'il n'est pas administré pendant un temps prolongé ni à des doses dépassant celles nécessaires à une thérapie efficace.

Zusammenfassung

Um die Wirkung von Chloramphenicol auf die Erythropoese zu untersuchen, wurden Reifung und Proliferation menschlicher und tierischer erythropoetischer Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß Chloramphenicol, wenn es nicht über längere Zeit und in Mengen, die die therapeutisch wirksamen Dosen nicht überschreiten, zugeführt wird, keine signifikanten Veränderungen von Reifung und Proliferation erythropoetischer Zellen herbeiführt.

References

1. Astaldi, G. e Mauri, C. La valutazione dell'attività proliferativa delle cellule midollari. Studio di un «test statmocinetico». Haematologica 33: 3 (1949).
2. Astaldi, G. and Tolentino, P. Studies in vitro on the maturation of erythroblasts in normal and pathological conditions. J. clin. Path. 2: 217 (1949).
3. Baldoni, E.: Sulla terapia del tifo addominale con cloramfenicolo. G. Mal. inf. parass. 1: 310 (1949).
4. Björkman, S. E.: Case of aplastic anemia caused by chloramphenicol with recovery after 22 months. Acta haemat. 27: 124 (1962).
5. Breitman, T. R. and Webster, G. C.: Effect of chloramphenicol on protein and nucleic acid synthesis in isolated thymus nuclei. Biochem. biophys. Acta 27: 408 (1958).
6. Erslev, A. J.: Hematopoietic depression induced by chloromycetin. Blood 8: 170 (1953).
7. Erslev, A. J. and Iossifides, I. A. In vitro action of chloramphenicol and chloramphenicol analogues on the metabolism of human immature red blood cells. Acta haemat. 28: 1 (1962).
8. Follette, J. H.; Shugarman, P. M.; Reynolds, J.; Valentine, W. N. and Lawrence, J. S. The effect of chloramphenicol and other antibiotics on leukocyte respiration. Blood 11: 234 (1956).
9. Fusillo, M. H.; Metzger, J. F. and Kuhns, D. M.: Effect of chloromycetin and streptomycin on embryonic tissue growth in in vitro cultures. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 79: 376 (1952).
10. Gioli, G. e Secchi, G. T. Sul comportamento della crasi ematica in ammalati di malbese trattati con cloramfenicolo. Rass. Fis.-Clin. Terapia 22: 1075 (1950).
11. Hodgkinson, R. Blood dyscrasias associated with chloramphenicol. Lancet i: 285 (1954).
12. Kämmerer, H. G. Kritische Beurteilung der Bluterkrankungen nach Anwendung von Chloramphenicol (Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1962).
13. Pomerat, C. M. and Leake, C. D. Short term cultures for drug assays: General considerations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 58: 1110 (1954).
14. Scarzella, M. Su alcuni casi di tifo trattati con aureomicina e cloramfenicolo. Min. Med. 40: 875 (1949).
15. Smiley, R. K.; Cartwright, G. E. and Wintrobe, M. M. Fatal aplastic anemia following chloramphenicol (chloromycetin) administration. J. amer. med. Ass. 149: 914 (1952).
16. Yunis, A. A. and Harrington, W. J. Patterns of inhibition by chloramphenicol of nucleic acids in human bone marrow and leukemic cells. J. Lab. clin. Med. 56: 831 (1960).

Authors' address: Prof. E. G. Rondanelli, Drs. P. Gorini and E. Magliulo, Dept. of Clinical Medicine, Univ. of Pavia, Pavia (Italy).

Acta haemat. 34 329–337 (1965)

Institute of Medical Pathology and Clinical Methodology of the University of Catania
(Dir. Prof. S. Signorelli)

Erythrocyte Enzymes in Thalassaemia and Thalasso-drepanocytosis

F. Belfiore, J. Meldolesi and G. Calcara

Enzymological researches have shown that in some forms of haemolytic anaemia the increased haemolysis is accompained by well defined enzymatic defects of the red cells (1–11). Even in normal conditions a clear correlation between lysis and metabolism of erythrocytes has been observed (12, 13).

These reports have led to an enzymatic study of erythrocytes in the thalassaemic syndromes in which haemolysis is markedly increased. The investigations carried out so far have shown in thalassaemic erythrocytes an increased activity of some enzymes, namely of ChE (14), aldolase (15–19), LDH (16–19), GOT (15, 17, 19), arginase (18), as well as of other enzymes of various metabolic pathways (19)*.

Since we consider this subject worthy of further investigation we have carried out the present research on several enzymatic activities of glycolysis, of oxidative shunt, of Krebs cycle as well as of other metabolic pathways, the preliminary results of which have already been reported (20–23).

Material and Methods

The activity of several enzymes in the red cells of patients with thalassaemia or thalassodrepanocytosis and in [illegible] of normal subjects was studied. The enzymatic [illegible]

* Abbreviations: [illegible]
ChE = Cholinesterase

determination was carried out on the haemolysates prepared by adding to one volume of red cells, previously washed three times in saline, four volumes of distilled water and then freezing and thawing three times. The volume of red cells was measured after centrifugation at 4000 r.p.m. for 10 min. In the patients with thalassaemia, cases of thalassaemia major and cases of thalassaemia minor were included.

The enzymatic activities determined and the number of subjects investigated are shown in Table I.

HK was measured according to CHAPMAN *et al.* (24) PHI according to BRUNS AND HINSBERG (25) PFK according to LING *et al.* (26), aldolase according to BRUNS (27), TIM according to MEYER-ARENDT *et al.* (28) utilizing the reaction 3-phosphoglyceraldehyde → dihydroxyacetone phosphate, GAPDH according to VELICK (29), PGK according to BÜCHER (30) utilizing the reaction 3-phosphoglycerate → 1,3-diphosphoglycerate, PTM and enolase according to CHAPMAN *et al.* (24) PK according to BÜCHER AND PFLEIDERER (31), LDH according to WROBLEWSKI AND LA DUE (32) GDH according to SCHMIDT *et al.* (33) fumarase according to RACKER (34) MDH was determined by method (35), based on the spectrophotometric measurement of the DPNH oxidation. G6PDH and 6PGDH was measured according to MARKS (36) GOT according to KARMEN (37) GPT according to WROBLEWSKI AND LA DUE (38) arginase by a modified method of HUNTER AND DAUPHINEE as we have elsewhere reported (39) AcPase according to ANDERSCH AND SZCZYPINSKI (40).

All activities have been reported in µmoles of transformed substrate in one minute from one ml of haemolysate, prepared as mentioned above. The reticulocyte count was performed after staining with brilliant cresyl blue, and the coefficient of correlation between enzymatic activity and percentage of reticulocytes was calculated. The results were statistically analysed.

Results

From Table I it can be seen, that in the red cells of patients with thalassaemia there was a statistically significant increase of almost all the enzymatic activities studied, with the exception of PFK, GDH and AcPase which were normal. In patients with thalassodrepanocytosis the increase concerns a smaller number of enzymes, namely HK, PHI aldolase, GAPDH, PK, LDH, G6PDH, 6PGDH, MDH, GOT GPT and arginase, while PFK, GDH, AcPase, TIM, PGK, PTM, enolase and fumarase were normal or showed modifications of no statistical significance.

The percentage of reticulocytes in our patients ranged from 2 to 30 %. The correlation coefficient between enzymatic activities and reticulocytosis showed no statistical significance for almost all the enzymatic activities studied, both in thalassaemia and in thalassodrepanocytosis, with exception of GOT which in thalassodrepanocytosis only showed a statistical significant correlation ($P < 0.05$)

A quantitative comparison of the various enzymatic activities of normal red cells (significant from a metabolic point of view since all the enzymatic activities have been expressed in µmoles of

Table I

Erythrocyte enzymatic activities in normal subjects and in patients with thalassaemia and thalassodrepanocytosis (μmoles of substrate/1 min/1 ml of haemolysate)

Enzyme	Normal	Thalassaemia			Thalassodrepanocytosis		
	Enzymatic activity*	Enzymatic activity*	per cent variation**	p**	Enzymatic activity*	per cent variation	p***
HK	0.0106 (14)	0.0311 (14)	+193	<0.05	0.0185 (7)	+ 74	=0,05
PHI	2.133 (22)	3.966 (23)	+ 86	<0.01	3.966 (18)	+ 86	<0.001
PFK	0 099 (13)	0.093 (16)	— 6	>0.50	0.098 (8)	— 1	>0.50
Ald.	0 090 (13)	0.123 (13)	+ 37	<0.05	0.124 (11)	+ 38	<0.001
TIM	29.005 (14)	45.930 (17)	+ 58	<0.05	27.650 (8)	— 4,6	>0.50
GAPDH	0.440 (14)	0.894 (18)	+103	<0.001	0.742 (8)	+ 68	<0.01
PGK	3.092 (13)	4.316 (17)	+ 40	<0.001	2.940 (8)	— 5	>0.50
PTM	0.106 (13)	0.238 (20)	+125	<0.05	0.149 (9)	+ 42	>0.10
Enol.	0 099 (14)	0.171 (16)	+ 73	=0.001	0.107 (8)	+ 7	>0.50
PK	0.095 (20)	0.171 (23)	+ 80	<0.001	0.192 (19)	+102	<0.01
LDH	2.024 (14)	2.526 (14)	+ 25	<0.001	2.680 (11)	+ 32	<0.01
GDH	0 0064 (13)	0.0068 (18)	+ 6	>0.20	0.0109 (8)	+ 70	<0.05
Fumar	0.864 (13)	1 456 (17)	+ 69	<0.01	0.968 (10)	+ 12	<0.60
MDH	2.380 (22)	3.051 (10)	+ 28	<0 02	2.940 (12)	+ 24	<0.05
G6PDH	0.068 (19)	0.116 (15)	+ 70	<0.01	0 093 (14)	+ 36	<0.01
6PGDH	0 073 (28)	0.121 (28)	+ 66	<0.001	0.091 (19)	+ 24	<0.05
GOT	0.017 (18)	0.039 (22)	+135	<0 001	0.075 (16)	+201	<0.001
GPT	0 0046 (18)	0.0077 (22)	+ 66	<0.05	0.0082 (16)	+ 77	<0.05
Arg	0.159 (15)	0.208 (15)	+ 30	<0.001	0.194 (12)	+ 21	<0.05
AcPase	0.013 (22)	0.0164 (23)	+ 6	>0.50	0.0166 (18)	+ 8	>0.05

* Mean values
** Variation in respect to normal
*** Level of statistical significance of the variation in respect to normal.
In brackets the number of subjects examined
— Abbreviations see page 330

substrate transformed in the time unit) shows a decrease in the following order TIM > PGK > MDH > PHI > LDH > Fum. >GAPDH > Arg > PTM > PFK = Enol. > PK > Ald. > 6PGDH > G6PDH > GOT > AcPase > HK > GDH > GPT

In thalassaemic red cells this quantitative relationship is changed and shows the following order TIM > PGK > PHI > MDH > LDH > Fum. > GAPDH > Arg > PTM > PK = Enol. > Ald. > 6PGDH > G6PDH > PFK > GOT > HK > AcPase > GPT > GDH

In patients with thalassodrepanocytosis there is the following order TIM > PHI > PGK = MDH > LDH > Fum. >

GAPDH > Arg > PK > PTM > Ald. > Enol. > PFK > G6PDH > 6GPDH > GOT > HK > AcPase > GDH > GPT

Discussion

Our results indicate that in thalassaemia and thalassodrepanocytosis there is an increase of various erythrocyte enzymes. This increase concerns a greater number of enzymes in thalassaemia than in thalassodrepanocytosis, and is of different degree for the different enzymes. It does not seem to be limited to enzymes regulating particular metabolic cycles, since it concerns enzymatic systems belonging to different metabolic pathways. To explain the significance of these enzymatic increases it is necessary to answer the question as to whether they constitute a characteristic of the thalassaemic erythrocytes, or whether they depend rather on the high percentage of young erythrocytes existing in the thalassaemic syndromes. It is, in fact, noted that the young erythrocytes, and in particular the reticulocytes, show in respect to the mature red cells, an increase in many enzymatic activities (41–49)

In an attempt to solve this question we have studied the coefficient of correlation between enzymatic activities and the percentage of reticulocytosis. This coefficient was seen to be no significant for almost all the enzymatic activities examined, except for GOT in patients with thalassodrepanocytosis, thus indicating that the enzymatic increase present in thalassaemic erythrocytes cannot be considered entirely dependent of the high reticulocytosis existing in these diseases.

However it must be considered that the study of the correlation between enzymatic activities and reticulocytosis does not solve the problem in an absolute sense, since an increase in enzymatic activities may also be determined by a high percentage of still *young erythrocytes which have already gone through* the reticulocyte phase and thus seem as non reticulated, a haematologic situation that may exist in certain patients at the moment of the investigation.

An other problem arising from the increased percentage of young erythrocytes in the thalassaemic syndromes concerns the enzymatic activities showing a normal level. Since these activities are increased in normal young erythrocytes, they should also be in

thalassaemic erythrocytes, which comprise a fair percentage of young elements. Considering that such enzymatic activities should normally be related to the immaturity of the erythrocytes, their apparently normal level in thalassaemia could correspond in fact to a diminished activity. If there existed in thalassaemia an enzymatic deficiency capable of shortening the life of erythrocytes and thus determining pathological haemolysis, there would follow a greater number of young erythrocytes in circulation, and this could compensate and hide a possible enzymatic deficiency. These considerations obviously have significance only as a work hypothesis, and will be verified by further research in this Institute.

The enzymatic determinations were carried out on haemolysates prepared with a standard *volume* of erythrocytes, instead of a standard *number* of them, and thus the enzymatic activity was referred to an constant mass of erythrocytes, independent of the variation in volume of the erythrocytes. If the activity is referred to a determined number of cells, the variations in the volume of erythrocytes determine a parallel modification of the cellular mass studied, and thus influence the results. This is of particular importance for the present research, as in thalassaemia the red cell volume is decreased (microcytosis).

By quantitative comparison a marked difference between the various enzymatic activities can be seen. This comparison is significant from a metabolic point of view since all enzymatic activities have been expressed in μmoles of substrate transformed in the time unit. Considering the various enzymatic activities according to their role in the various metabolic pathways, some observation can be made, particularly concerning the enzymes of glycolysis. In normal erythrocytes the lowest values among the enzymatic activities of glycolysis have been shown for aldolase and above all for HK, which must then be considered a limiting factor of glycolysis in the erythrocytes. In thalassaemia and thalassodrepanocytosis there are some modifications in the quantitative relationship of the various enzymatic activities of glycolysis: the one presenting the lowest values, and therefore becoming a limiting factor was HK, followed by PFK.

It can be concluded that in thalassaemia and thalassodrepanocytosis there exists in erythrocytes an increase of many enzymatic activities with normal values in others. With regard to the possible relationship between enzymatic alteration and increased haemolysis

it would seem that particular significance can be attributed to the enzymes showing a normal level. As thalassaemic erythrocytes are composed of relatively young cells showing normally a high level of enzymatic activities, the apparently normal values in thalassaemia could really be considered diminished. However obvious and definite enzymatic alterations to which the increased haemolysis in thalassaemia and thalassodrepanocytosis could be attributed, have not been seen during our research.

Summary

All the enzymatic activities of glycolysis, some of the oxidative shunt (glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase) and of other metabolic pathways (glyceric phosphate dehydrogenase, glutamic-oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase, arginase and acid phosphatase) were studied in the erythrocytes of normal subjects and of patients with thalassaemia or thal[illegible] ... hosis. In thalassaemia there was in increase of almost all the enzymatic activities, except for phosphofructokinase, glyceric phosphate dehydrogenase and acid phosphatase. In thalassodrepanocytosis the increase concerned minor number of enzymes, namely hexokinase, phosphohexoseisomerase, aldolase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, pyruvic kinase, lactic acid- glucose-6-phosphate- 6-phosphogluconate- and malic-dehydrogenases, glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminases and arginase. These increases were not correlated with the reticulocytosis. Among the enzymes of glycolysis those of the lowest values and thus bearing a significance as limiting factors, are hexokinase and aldolase in normal erythrocytes and hexokinase and phosphofructokinase in thalassaemic erythrocytes. The possibility has been put forward that in the thalassaemic syndromes the enzymatic activities appearing to be normal should in fact be considered as diminished, the diminution being masked by the presence of young erythrocytes, which notoriously have an increased enzymatic activity

Résumé

Dans les érythrocytes d'individus sains et de malades atteints de thalassémie et de thalassodrépanocytose, nous avons étudié les enzymes de la glycolyse, du shunt oxydatif et de quelques autres processus du métabolisme. Dans la thalassémie, nous avons trouvé une augmentation de presque tous les enzymes à l'exception de la phosphofructosekinase, de la glycérophosphate-déshydrogénase et de la phosphatase acide. Dans la thalassodrépanocytose, cette augmentation touche un mineur nombre d'enzymes, à savoir l'hexokinase, la phosphohexose-isomérase, l'aldolase, la glycéroaldehydephosphate-déshydrogénase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la 6-phosphogluconate-déshydrogénase, la malate-déshydrogénase, les transaminases glutamiques oxalo-acétique et pyruviques, ainsi que l'arginase. Ces augmentations n étaient pas en relation avec la réticulocytose. Parmi les enzymes de la glycolyse qui ont les valeurs les plus basses et par là une importance en tant que facteurs limitatifs, se trouvent dans les érythrocytes normaux l'hexokinase et la aldolase, dans les érythrocytes thalassémiques l'hexokinase et la phosphofructose-kinase. La possibilité est mise en avant que les activités enzymatiques apparemment normales dans les syndromes de thalassémie doivent être considérées comme étant diminuées, cette diminution n étant pas manifeste vu la présence d'érythrocytes jeunes.

Zusammenfassung

In Erythrozyten von Gesunden und von Patienten mit Thalassämie und Thalassodrepanozytose wurden die Enzyme der Glykolyse, einige des oxydativen Shunt (Glukose-6-phosphat- und 6-Phosphoglukonat-dehydrogenase) und anderer Stoffwechselprozesse (Glycerophosphatdehydrogenase, Glutamin-Oxalessigsäure- und Glutamin-Pyruvat Transaminasen, Arginase und saure Phosphatase) untersucht. Bei der Thalassämie fand sich eine Zunahme der Aktivität fast aller Enzyme, mit Ausnahme der Phosphofruktokinase, der Glycerophosphatdehydrogenase und der sauren Phosphatase. Bei der Thalassodrepanozytose betraf diese Zunahme eine kleinere Zahl von Enzymen, nämlich der Hexokinase, der Phosphohexoisomerase, der Aldolase, der Glyceroaldehydphosphatdehydrogenase, der Pyruvatkinase, der Milchsäure- Glukose-6-phosphat-, 6-Phosphoglukonat und Malonsäuredehydrogenasen, sowie der Glutamin-Oxalessigsäure und der Glutamin-Pyruvat-Transaminasen und der Arginase. Diese Zunahmen standen nicht in Beziehung zur Retikulozytose. Unter den Enzymen der Glykolyse weisen in normalen Erythrozyten die Hexokinase und die Aldolase bei der Thalassämie die Hexokinase und die Phosphofructokinase die niedrigsten Werte auf und dürften damit als limitierende Faktoren von Bedeutung sein. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß bei den Thalassämie-Syndromen die scheinbar normalen Enzymaktivitäten in Wirklichkeit als vermindert zu betrachten sind, wobei diese Verminderung zufolge der Gegenwart jugendlicher Erythrozyten nicht zur Geltung kommt.

References

1. Carson, P. E.; Flanagan, C. L.; Ickes, C. E. and Alving, A. S.: Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes. Science *124*: 484 (1956).
2. Waller, H. D.; Löhr, G. W. und Tabatabai, M.: Haemolyse und Fehlen von Glucose-6-phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten). Klin. Wschr. *35*: 1022 (1957).
3. Szeinberg, A.; Sheba, Ch. and Adam, A.: Enzymatic abnormality in erythrocytes of population sensitive to vicia faba or drug induced hemolytic anemia. Nature, *181*: 1256, 1958.
4. Larizza, P.; Brunetti, P.; Grignani, F. e Ventura, S.: La individualità biochimica dell'eritrocita fabico. Sopra alcune anomalie biochimiche ed enzimatiche delle emazie nei pazienti affetti da favismo e nei loro familiari. Haematologica *43*: 205 (1958).
5. Sansone, G. e Segni, G.: Nuovi aspetti dell'alterato biochimismo degli eritrociti di favici: assenza pressoché completa della glucosio-6-fosfatodeidrogenasi. Boll. Soc. It. Biol. Sper. *33*: 327 (1958).
6. Zinkham, W. H.; Lenhard, R. E. and Childs, B.: A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism. Bull. Johns Hopk. Hosp. *102*: 169 (1958).
7. Shahidi, N. T. and Diamond, L. K.: Enzyme deficiency in erythrocytes in congenital nonspherocytic hemolytic anemia. Pediatrics *24*: 245 (1959).
8. Tanaka, K. R.; Valentine, W. N. and Miwa, S.: Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. Blood *19*: 267 (1962).
9. Brunetti, P.; Grignani, F. and Rapelli, G.: The behavior of the erythrocyte pyrophosphatase activity in the enzyme-deficiency hemolytic anemia. II. A new test for the detection of enzyme defect. Acta haemat. (Basel) *27*: 248 (1962).
10. Prankerd, T. A. J.: The nature of the erythrocyte defect and the haemolytic mechanism in hereditary spherocytic and hereditary nonspherocytic haemolytic

anemia. Freiburger Symp. über Haemolyse und hämolytische Erkrankungen 1959 (Springer Berlin/Heidelberg/New York 1961)
11 Löhr, G W Nichtsphärocytäre hämolytische Anämien. Erbliche Stoffwechsel-Krankheiten. (Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1962)
12. Löhr, G. W Waller, H. D; Karges, O; Schlegel, B. und Muller, A. Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. Klin. Wschr 36. 1008 (1958)
13. Löhr, G. W und Waller, H. D Zur Biochemie der Erythrocyten-Alterung. Folia Haemat. (Lpz.) 78 385 (1961)
14 Sabine, J C.: Erythrocyte cholinesterase titers in hematologic disease states. Amer J Med. 27 81 (1959)
15. Corrado, F Manfredi, G. Pintozzi, P Gaggiari, E. Proteine, lipidi alcuni enzimi del globulo rosso della sua frazione stromatica in varii casi di emopatie infantili. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper 35 1014 (1959)
16. Mangianelli, G e Saponaro V: La latticodeidrogenasi eritrocitaria nella emopatia mediterranea. Bioch. Appl. 6. 388 (1959)
17 Sass, M. D and Spear, P W Red Cell transaminase levels in anemia. II Thalassemia minor J Lab. Clin. Med. 58 580 (1961).
18. Reynolds, J Follette, J H. and Valentine, W N: The arginase activity of erythrocytes and leukocytes with particular reference to pernicious anemia and thalassemia major J Lab. Clin. Med. 50 78 (1957)
19 Gerchani, F Loehr, G W Brunetti, P et Waller, H. D. Le métabolisme énergétique de l'érythrocyte thalassémique. Acta Haemat. 28. 293 (1962)
20. Tropeano, L.; De Stefano, S. Belfiore, F Attività transaminasica G.O. G.P aldolasica latticodeidrogenasica negli emolisati di soggetti normali ed emopatici. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper 36 1319 (1960.
21 Belfiore, F L attività aldolasica degli eritrociti nella talassemia nella talassodrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper 38. 511 (1962)
22. Belfiore, F: L attività latticodeidrogenasica degli eritrociti nella talassemia nella talassodrepanocitosi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper 38. 514 (1962)
23. Tropeano, L. Belfiore, F Alcune attività enzimatiche negli eritrociti di ammalati portatori di talassemia di talassodrepanocitosi. Haematol. Latina 5: 283 (1962)
24. Chapman R. G Hennessey M. A. Waltersdorph, A. M.; Huennekens, F M. and Gabrio, B. W Erythrocyte metabolism. V Level of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis. J clin. Invest. 41 1249 (1962)
25. Bruns, F H. und Hinsberg, K. Bestimmung und Eigenschaften der Phosphohexoseisomerase des Serums. Biochem. Z. 325. 532 (1953/54).
26. Ling, K. Byrne, W L. and Lardy H. Phosphofructokinase; in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. I p. 307 (New York Academic Press, 1955)
27 Bruns, F H.: Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase. Biochem. Z. 325 156 (1954)
28. Meyer-Arendt E.; Beisenherz, G und Bücher, T Isolierung der Triosephosphat-isomerase. Naturwissenschaften 40. 59 (1953)
29. Velick, S. F Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from muscle; in Colowick's and Kaplan's Method in Enzymology Vol. I p. 401 (New York Academic Press, 1955).
30. Bücher, T Phosphoglycerate-kinase from Brewer's yeast; in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. I p. 415 (New York Academic Press, 1955)
31 Bücher, T and Pfleiderer, G: Pyruvate kinase from muscle in Colowick's and Kaplan's Methods in Enzymology Vol. I p. 435 (New York Academic Press, 1955).

32. Wróblewski, F. and La Due, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. *90* 210 (1955).
33. Schmidt, E., Schmidt, F. W. und Wildhirt, E. Vergleichende Aktivität-Bestimmung von Enzymen des Energieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen und in der Rattenleber. Klin. Wschr. *36*, 172 (1958).
34. Racker, E.: Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochim. Biophys. Acta *4* 211 (1950).
35. Biochemica Boehringer 1961.
36. Marks, P. A. Red cell glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenase and nucleoside phosphorylase. Science *127* 1338 (1958).
37. Karmen, A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. J. clin. Invest. *34* 131 (1955).
38. Wróblewski, F. and La Due, J. S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic diseases. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. *91* 569 (1956).
39. Teofrano, L. e Belfiore, F. L'attività arginasica nel siero di sangue di epatopatici. Progr. Med. (Napoli) *18*, 7 (1962).
40. Andersch, M. A. and Szczypinski, A. J. Use of p-nitrophenylphosphate as substrate in determination of serum phosphatase. Amer. J. clin. Path. *17* 571 (1947).
41. Rubinstein, D.; Ottolenghi, P. and Denstedt, O. F. The metabolism of erythrocyte. XIII. Enzyme activity in the reticulocyte. Canad. J. Biochem. Physiol. *34* 222 (1956).
42. Marks, P. A., Johnson, A. B.; Hirschberg, E. and Banks, J. Studies on the aging of human red blood cell. Ann. N.Y. Acad. Sci. *75*, 95 (1958).
43. Rapoport, S. Reifung und Alterungsvorgänge in Erythrocyten. Folia Haemat. (Lpz.) *78* 364 (1961).
44. Belfiore, F. Attività malicodeidrogenasica nei reticolociti e nei normociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *39* 743 (1963).
45. Belfiore, F. Attività transaminasica glutammico-ossalacetico (GOT) e glutammico-piruvico (GPT) ed attività arginasica nei reticolociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *39* 749 (1963).
46. Belfiore, F. e Meldolesi, J. Attività glucosio-6-fosfatodeidrogenasica, fosfoesosoisomerasica, aldolasica e latticodeidrogenasica nei reticolociti e nei normociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *39* 754 (1963).
47. Belfiore, F. e Meldolesi, J. Attività piruvatochinasica, 6-fosfogluconatodeidrogenasica ed ATPasica dei reticolociti e dei normociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *39* 1574 (1963).
48. Belfiore, F.; Calcara, G. e Bonaventura, S.: Attività isocitrico-deidrogenasica dei reticolociti e dei normociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *39* 1577 (1963).
49. Belfiore, F., Meldolesi, J. e Calcara, G. Attività esochinasica, fosfofruttochinasica, gliceraldeidefosfatodeidrogenasica e fosfogliceratochinasica nei reticolociti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. *40* 1034 (1964).

Authors' address: Drs. F. Belfiore, J. Meldolesi and G. Calcara, Inst. of Medical Pathology, University of Catania, Catania (Italy).

Acta haemat. 34: 338–346 (1965)

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik Zürich (Direktor: Prof. R. Hegglin)

Hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation

A. Ganzoni und F. Rhomberg

Der Mangel oder selten das völlige Fehlen (15, 11) an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD) der Erythrozyten – bei gewissen Rassen und Völkern beim männlichen Geschlecht weit verbreitet (1) – äußert sich in akuten hämolytischen Krisen bei latenter kompensierter Hämolyse (4) unter dem Einfluß meist therapeutisch verabreichter chemischer Stoffe (Primaquine, Nitrofurantoin u. a.) sowie nach Genuß der Saubohne *(Vicia fava)* (Übersicht bei 17). Selten sind chronische hämolytische Anämien ohne Einwirkung von Fremdsubstanzen (2, 11, 22). Der Fermentdefekt wird an das X-Chromosom gebunden mit mäßiger Penetranz vererbt. Heterozygote Trägerinnen sind klinisch gewöhnlich gesund. Die G-6-PD zeigt mehrere genetische Varianten (24, 3, 16). Der Enzymdefekt ist bei verschiedenen Populationen uneinheitlicher Natur (2, 20). Bei amerikanischen Negern verläuft das Krankheitsbild milder als bei Europäern. Die biochemischen Grundlagen des Erythrozytenunterganges, soweit sie abgeklärt sind, scheinen aber prinzipiell immer die gleichen zu sein. Es wurde gezeigt, daß nicht stets ein Mangel an G-6-PD vorhanden ist, sondern das Fehlen eines stromagebundenen Fermentaktivators nachgewiesen (26). Andererseits ist auch ein Inhibitor des Fermentes bekannt (8).

Kürzlich beobachteten wir einen jungen Italiener mit schwerer Hämolyse, welcher neben den Symptomen der subakuten Bleivergiftung einen ausgesprochenen Mangel an G-6-PD aufwies. In der Literatur sind wir dieser Kombination nicht begegnet. Der Krankheitsverlauf sei in der Folge kurz geschildert, der mögliche Zusammenhang zwischen den pathogenetischen Faktoren, Blei und Fermentdefizit, in bezug auf die Hämolyse diskutiert.

%
80
50
44
64
Haemoglobin

‰
150
50
180
14
Reticulocyten

%
60
40
65
35
Serum Pb
(Norm 10–20 γ%)

5 10 15 20 25 30 Tage

58
538
EC γ/100 ml
EP γ/100 ml
47
503

1540 UP γ/24 Std.

1000 30000 5000 U-δ-ALA γ/24 Std. 7800 470

à 500 ml
Na EDTA 1%

Abb. 1 Verlauf der Erkrankung. EC = Erythrocytencoproporphyrin. EP = Erythrocytenprotoporphyrin. UP = Urincoproporphyrin. U-δ-ALA = Urin-δ-Aminolävulinsäure.

Kasuistik (F Schertmann, 1936, Südtaliener KG-N 435/63, Med. Pol.) Ernstliche Krankheiten in der Vorgeschichte fehlen. Episoden von Anämie oder Gelbsucht werden verneint. Seit anfangs Oktober 1963 ist der Patient mit Reinigungsarbeiten von Akkumulatoren beschäftigt. Mitte November 6 Wochen später treten kolikartige, abdominelle Schmerzen auf, gleichzeitig bestehen Obstipation, große Nervosität, Schlaflosigkeit. Eine weitere Woche danach, am 22. November 1963, erfolgt die Hospitalisation auf der Medizinischen Universitätspoliklinik Zürich.

Acta haemat. 34 338–346 (1965)

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik Zürich (Direktor: Prof. R. Hegglin)

Hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation

A. Ganzoni und F. Rhomberg

Der Mangel oder selten das völlige Fehlen (15 11) an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PD) der Erythrozyten – bei gewissen Rassen und Völkern beim männlichen Geschlecht weit verbreitet (1) – äußert sich in akuten hämolytischen Krisen bei latenter kompensierter Hämolyse (4) unter dem Einfluß meist therapeutisch verabreichter chemischer Stoffe (Primaquine, Nitrofurantoin u. a.) sowie nach Genuß der Saubohne *(Vicia faba)* (Übersicht bei 17) Selten sind chronische hämolytische Anämien ohne Einwirkung von Fremdsubstanzen (2 11 22) Der Fermenteffekt wird an das X-Chromosom gebunden mit mäßiger Penetranz vererbt. Heterozygote Trägerinnen sind klinisch gewöhnlich gesund. Die G-6-PD zeigt mehrere genetische Varianten (24 3 16) Der Enzymdefekt ist bei verschiedenen Populationen uneinheitlicher Natur (2, 20) Bei amerikanischen Negern verläuft das Krankheitsbild milder als bei Europäern. Die biochemischen Grundlagen des Erythrozytenunterganges, soweit sie abgeklärt sind, scheinen aber prinzipiell immer die gleichen zu sein. Es wurde gezeigt, daß nicht stets ein Mangel an G-6-PD vorhanden ist, sondern das Fehlen eines stromagebundenen Fermentaktivators nachgewiesen (26) Andererseits ist auch ein Inhibitor des Fermentes bekannt (8)

Kürzlich beobachteten wir einen jungen Italiener mit schwerer Hämolyse, welcher neben den Symptomen der subakuten Bleivergiftung einen ausgesprochenen Mangel an G-6-PD aufwies. In der Literatur sind wir dieser Kombination nicht begegnet. Der Krankheitsverlauf sei in der Folge kurz geschildert, der mögliche Zusammenhang zwischen den pathogenetischen Faktoren, Blei und Fermentdefizit, in bezug auf die Hämolyse diskutiert.

Der Hämolyse scheint die direkte Wirkung des Metalls auf den Erythrozyten zugrunde zu liegen. Mögliche Angriffspunkte des Bleis werden weiter unten diskutiert, sicher erfolgt eine Elektrolytstörung in Form zellulären Kaliumverlustes (14).

Die fehlende Kompensation der leichten Hämolyse und der hypochrome Charakter der Anämie schließen auf die zusätzliche Störung der Erythropoese. Durch markiertes Glycin wurde neuerdings die Hemmung der Globinsynthese unter Bleiwirkung gezeigt (14). Bekannter ist die Störung der Hämsynthese. Gesichert sind die Blockierung der Umwandlung der δ-Aminolävulinsäure (δ-ALA) in Porphobilinogen über Hemmung der δ-ALA Dehydrase sowie die Hemmung des Einbaus des Eisenmoleküls in den Protoporphyrinring durch Inaktivierung der Hämsynthetase. Beide Fermente enthalten funktionell bedeutungsvolle SH-Gruppen, die offenbar durch Blei inaktiviert werden (9, 21). Die erhöhte Urinausscheidung der δ-ALA sowie die Anhäufung von Protoporphyrin intraerythrozytär bilden die bekannten, chemisch faßbaren Korrelate dieser beiden Störungen.

Die regelmäßig vermehrte Coproporphyrinausscheidung im Urin und die Anhäufung dieses Porphyrins in den roten Blutzellen ließen die Hemmung der Umwandlung von Copro- in Protoporphyrinogen vermuten. Gegen diese Annahme sprechen das Fehlen essentieller Sulfhydrylgruppen im verantwortlichen Enzym sowie der dominierende Gehalt an erythrozytärem Protoporphyrin. Die vermehrte Coproporphyrinausscheidung läßt sich durch die nachgewiesene Synthese von Coproporphyrin aus δ-ALA in der Niere erklären (27), die Erhöhung des Erythrozytencoproporphyrins als Rückstaueffekt hinter dem angehäuften Protoporphyrin.

Unbewiesen ist die ebenfalls postulierte Hemmung der δ-ALA-Bildung aus aktivierter Bernsteinsäure und Glykokoll (9).

Die Störung der Hämsynthese macht den hypochromen Charakter der Anämie verständlich. Eisen tritt wohl in die Erythroblasten und Retikulozyten ein, wird aber in inaktiver Form eingelagert. Mit der Berlinerblaufärbung lassen sich vermehrt Sideroblasten und Siderozyten nachweisen.

2. *Die Anämie bei G-6-PD-Mangel* (Übersichten bei 14, 17). Die G-6-PD ist das erste Enzym in der Reaktionskette des Pentosephosphatzyklus (PP-Zyklus). Das entstehende 6-Phosphat-Glukonat wird in einem zweiten Schritt zu 3-Keto-6-Phosphat-Glukonat

dehydriert. Beide Reaktionen liefern aus NADP* NADPH₂. Letzteres überträgt unter der Wirkung der Glutationreduktase Wasserstoff auf oxydiertes Glutathion (GSSG) und liefert reduziertes Glutathion (GSH).

Bei Mangel an G-6-PD ist auf Grund der quantitativ ungenügenden Einschleusung von Glukose-6-Phosphat in den PP Zyklus der GSH-Gehalt der Erythrozyten vermindert. Genügende GSH Konzentration hat für den Erythrozyten vitale Bedeutung. Membran und Enzym-Sulfhydrylgruppen werden durch GSH stabilisiert, u. a. ist auch die Aktivität der G-6-PD vom reduzierten Glutathion abhängig (25). GSH dient als Wasserstoffdonator der Glutathionperoxydase, welche unter der Einwirkung von Oxydantien entstehenden Wasserstoffsuperoxyd in Wasser umgewandelt (25).

Hier liegt zum mindesten einer der Angriffspunkte der hämolyseauslösenden Stoffe beim erblichen G-6-PD-Mangel. Primaquine, Nitrofurantoin, Phenylhydrazin u. a. bewirken die Bildung von H_2O_2 im Erythrozyten (10), massiven Abfall des zellulären GSH (18, 25, 28) mit gleichzeitigem Anstieg des GSSG. Eine Hypothese des Wesens der nun eintretenden akuten Hämolyse beruht auf der Annahme von Reaktionen zwischen GSSG mit Thiolgruppen verschiedener «SH Enzyme» (G-6-PD!) und Membranstrukturen, was den Untergang der Zelle zur Folge haben soll.

Andere Autoren stellen den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der Erythrozyten als Ursache des beschleunigten Zelluntergangs in den Vordergrund. Unter der Einwirkung von Primaquine, Furadantin und anderen Oxydantien, auch der Vicia fava, sinkt neben dem $NADPH_2$ auch der $NADH_2$-Gehalt der roten Blutzellen. Die Stabilisierung des reduzierten Glutathions erfolgt tatsächlich nicht ausschließlich unter Vermittlung der Codehydrase II, welche der PP Zyklus liefert, sondern durch eine $NADH_2$-abhängige zweite Glutathionreduktase, die mit dem glykolytischen Abbau (Embden-Meyerhof Weg) der Glukose in Verbindung steht. Unter oxydativem Stress – bei bestehendem G-6-PD-Defizit – wird auch dieses System insuffizient und ist nicht imstande, die notwendige GSH Konzentration aufrecht zu erhalten (25).

NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid = DPN = Codehydrase I
NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat = TPN = Codehydrase II

Die Erschöpfung der Reserven an Codehydrase I hat zudem die Verlangsamung der Glykolyse zur Folge Pyruvat wird nicht mehr in genügendem Umfange zu Milchsäure reduziert, der Gehalt an Brenztraubensäure und ihrer unmittelbaren Vorläufer nimmt zu damit leidet die Substratkettenphosphorylierung die Konzentration von ATP sinkt, diejenige von ADP steigt an (18, 22)

Der Mangel an energiereichem Phosphat – wie er auch dem alten Erythrozyten eigen ist – wird zum Teil als ausreichend für den Eintritt der Hämolyse angesehen (18) Wahrscheinlich ist der Mechanismus wesentlich komplexer (2 5 22, 28) Strukturelle Schäden der kompliziert gebauten Erythrozytenmembran, z. B durch Reaktion mit GSSG der damit eintretende intrazelluläre Kaliumverlust und das Versagen der ATP abhängigen Ionenpumpe dürften den tatsächlichen pathogenetischen Vorgängen des vorzeitigen Zelluntergangs näher kommen. Zu erwähnen ist die Abnahme des zellulären Lipidgehaltes, der ebenfalls mit der Hämolyse in Verbindung gebracht wird (2)

Schließlich erfahren weitere Fermente eine Erniedrigung (Hexokinase, Pyrophosphatase) wobei wiederum die präzisen pathogenetischen Vorgänge der Abklärung bedürfen (5, 23)

Die biochemischen und hämatologischen Konsequenzen bei G-6-PD-Mangel sind denjenigen sehr nahe stehend, wie sie bei hereditärem Mangel an GSH (23) oder Glutathionreduktase (7 19) eintreten.

5 Zusammenhang zwischen G-6-PD-Mangel und Bleiwirkung Die schwere Hämolyse unseres Patienten ist durch alleinige Einwirkung des Metalls schwer erklärbar Die Bleiwerte im Serum und die Ausscheidung der δ-ALA im Urin lassen nicht mehr als eine mittelschwere Bleiintoxikation annehmen. Außerdem sind derartige hämolytische Krisen bei Bleivergiftung eine Rarität. Es stellt sich damit die Frage des Zusammenhanges zwischen den beiden Syndromen.

Bekannt ist die Affinität des Bleis, wie anderer Schwermetalle, zu den SH-Gruppen von Enzymen und anderen Proteinen (9) Auch die G-6-PD enthält essentielle Sulfhydrylgruppen. Die Aktivität dieses Enzyms wurde bei unserem Patienten nur während der akuten Krankheitsphase bestimmt und zeigte eine Erniedrigung auf 6% der Norm. Grundsätzlich wäre damit ein »toxischer Favismus« zu diskutieren, die ausschließlich durch die Einwirkung

des Schwermetalls bedingte Fermentverminderung. Diese Annahme ist wenig wahrscheinlich: hämolytische Krisen bei Bleivergiftung sollten in diesem Falle viel häufiger zur Beobachtung gelangen, und wohl auch unter der Wirkung anderer Schwermetalle, z. B. Quecksilber, auftreten. Kürzlich beobachteten wir zwei Fälle von Bleiintoxikation, die auf der Höhe der Erkrankung normale Aktivitäten der G-6-PD aufwiesen. Wir sind berechtigt, bei unserem Patienten den genetisch bedingten Enzymdefekt anzunehmen.

Blei greift sicher nicht als Oxydans in den Zellstoffwechsel ein, wie das für die üblicherweise hämolyseauslösenden Substanzen beim Favismus gilt und führt damit wohl kaum zur Bildung von Wasserstoffsuperoxyd. Es scheint naheliegender die direkte Wirkung auf Thiolgruppen der Erythrozytenmembran (14, 29) sowie, auf gleichem Wege, die unmittelbare Inaktivierung von GSH zu vermuten. In der Folge führen dieselben Vorgänge wie bei der drogeninduzierten Hämolyse zum Zelluntergang. Leider wurde die Bestimmung des reduzierten Glutathions bei unserem Patienten unterlassen.

Der Krankheitsverlauf unseres Patienten gleicht demjenigen des typischen Favismus. Die nach ca. 1 Woche einsetzende ausgeprägte Regeneration, einhergehend mit Retikulozytose bis 180‰, ist charakteristisch. Die junge Zellpopulation, ausgestattet mit einem leistungsfähigen Fermentmuster, auch höheren Gehalt an G-6-PD, ist der Einwirkung der Noxe gewachsen. Bei hämolytischer Bleianämie haben wir allerdings ebenfalls rasche Erholung gesehen. Die Wirkung der EDTA-Infusionen, zur prompten Senkung der Blutbleiwerte führend, ist möglicherweise an der raschen Korrektur des Krankheitsbildes mitbeteiligt.

Zusammenfassung

Die Beobachtung eines Patienten mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel, bei welchem im Zusammenhang mit einer mittelschweren Bleiintoxikation eine akute hämolytische Krise ausbricht, veranlaßt die Gegenüberstellung dieser beiden pathogenetischen Faktoren für die Anämie. Die hämatologischen Veränderungen durch Blei: Hämolyse, Störung der Globin- und Hämsynthese – sowie diejenigen durch Mangel an G-6-PD erfahren ihre Darstellung. Es wird angenommen, daß Blei nicht als Oxydans in den Erythrozytenstoffwechsel eingreift, wie dies beim typischen Favismus der Fall ist, sondern die direkte Blockierung essentieller Sulfhydrylgruppen eintritt. Der Mechanismus des Zelluntergangs beschreitet dann dieselben Wege wie bei der drogeninduzierten Hämolyse. Die biochemischen Grundlagen der beschleunigten Zerstörung der roten Blutkörperchen werden diskutiert.

Summary

The observation of an acute haemolytic crisis associated with moderate degree of lead poisoning in patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency provides the occasion for comparison of these pathogenetic factors for anaemia. The haematological changes brought about by lead poisoning—haemolysis, disturbance of globin and haem synthesis—and by G-6-PD deficiency are described. It is assumed that lead poisoning does not act as an oxidant on the erythrocyte metabolism as is the case in typical fa ism, but by the direct blocking of essential sulfhydryl groups. The process of cell destruction follows the same course as with drug-induced haemolysis. The biochemical basis of the accelerated destruction of the red cells is discussed.

Résumé

L observation d'un malade tteint d'un manque en glucose-6-déshydrogénase et chez lequel une crise hémolytique survint à la suit d'une intoxication plomb d un degré moyen, incita à la confrontation du rôle que ces deux facteurs ont joué dans la pathogénèse de l'anémie. Les altérations hématologiques causées par le plomb – hémolyse, perturbation de la synthèse de la globine et de l'hème – ainsi que celle causée par le manque de G-6-PD sont décrites. Il semble que le plomb intervienne pas dans le métabolisme des érythrocytes en tant qu agent oxydant, comme est le cas dans le favisme typique, mais que les groupes sulfhydryles soient directement bloqués. La destruction des cellules se fait de la même façon que dans les hémolyses médicamenteuses. Les mécanismes biochimiques fondamentaux de la destruction accélérée des érythrocytes sont discutés.

Literatur

2 BERNARD, J NAJEAN, Y SCHALOM, C. ET TANZER J Les manifestations aigues du déficit en glucose-6-phosphate déhydrogénase. Bull. Soc. méd. Hôp. Paris 115. 439 (1964).

BOUSSER, J ET POVIN, P L anémie hémolytique chronique vec déficit en glucose-6-phosphate déhydrogénase. Bull. Soc. méd. Hôp. Paris 115. 467 (1964).

3 BOYER, S. H. PORTER, I. H. AND WEILBACHER, R. G. Electrophoretic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and its relationship to enzyme deficiency in man. Proc. Nat. Acad. Sci. 48. 1868 (1962)

4 BREWER, G. J. TARLOV A. R. AND KELLERMEYER, R. W The hemolytic effect of primaquine. XII Shortened erythrocyte life span in primaquine sensitive male negroes in the absence of drug administration. J Lab. clin. Med. 48 217 (1961).

5 BREWER, G. J ; POWELL, R. D ND ALVING, A. S Studies on the mechanism of the primaquine-type hemolysis Erythrocyte ATP-content and hexokinase activity J Lab. clin. Med. 60 861 (1962)

6 CARSON, P E. BREWER, G J AND ICKES, C. Decreased glutathione reductase with susceptibility to hemolysis J Lab. clin. Med 58 804 (1961)

7 CARSON, P E.; OHTA, G T FRISCHER, H. HIRASA, I ; LONG, W K. AND BREWER, G J. Patterns of hemolytic susceptibility and metabolism. Proc. 9th Congr Europ Soc. Haemat. Lissabon 1963 p 655 (Karger Basel/New York 1963)

8 CARSON, P E. SCHRIER, S L. AND ALVING A. S Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocy es (abstract) J Lab. clin. Med. 48. 794 (1956).

9 CHISHOLM, L. J Disturbances in the biosynthesis of heme in lead intoxication. J. Pediat. 64 174 (1964)

des Schwermetalls bedingte Fermentverminderung. Diese Annahme ist wenig wahrscheinlich: hämolytische Krisen bei Bleivergiftung sollten in diesem Falle viel häufiger zur Beobachtung gelangen, und wohl auch unter der Wirkung anderer Schwermetalle, z. B. Quecksilber, auftreten. Kürzlich beobachteten wir zwei Fälle von Bleiintoxikation, die auf der Höhe der Erkrankung normale Aktivitäten der G-6-PD aufwiesen. Wir sind berechtigt, bei unserem Patienten den genetisch bedingten Enzymdefekt anzunehmen.

Blei greift sicher nicht als Oxydans in den Zellstoffwechsel ein, wie das für die üblicherweise hämolyseauslösenden Substanzen beim Favismus gilt und führt damit wohl kaum zur Bildung von Wasserstoffsuperoxyd. Es scheint naheliegender, die direkte Wirkung auf Thiolgruppen der Erythrozytenmembran (14, 29) sowie, auf gleichem Wege, die unmittelbare Inaktivierung von GSH zu vermuten. In der Folge führen dieselben Vorgänge wie bei der drogeninduzierten Hämolyse zum Zelluntergang. Leider wurde die Bestimmung des reduzierten Glutathions bei unserem Patienten unterlassen.

Der Krankheitsverlauf unseres Patienten gleicht demjenigen des typischen Favismus. Die nach ca. 1 Woche einsetzende ausgeprägte Regeneration, einhergehend mit Retikulozytose bis 180‰, ist charakteristisch. Die junge Zellpopulation, ausgestattet mit einem leistungsfähigen Fermentmuster, auch höheren Gehalt an G-6-PD, ist der Einwirkung der Noxe gewachsen. Bei hämolytischer Bleianämie haben wir allerdings ebenfalls rasche Erholung gesehen. Die Wirkung der EDTA-Infusionen, zur prompten Senkung der Blutbleiwerte führend, ist möglicherweise an der raschen Korrektur des Krankheitsbildes mitbeteiligt.

Zusammenfassung

Die Beobachtung eines Patienten mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel, bei welchem im Zusammenhang mit einer mittelschweren Bleiintoxikation eine akute hämolytische Krise ausbrach, veranlaßt die Gegenüberstellung dieser beiden pathogenetischen Faktoren für die Anämie. Die hämatologischen Veränderungen durch Blei – Hämolyse, Störung der Globin- und Hämsynthese – sowie diejenigen durch Mangel an G-6-PD erfahren ihre Darstellung. Es wird angenommen, daß Blei nicht als Oxydans in den Erythrozytenstoffwechsel eingreift, wie dies beim typischen Favismus der Fall ist, sondern die direkte Blockierung essentieller Sulfhydrylgruppen einleitet. Der Mechanismus des Zelluntergangs beschreitet dann dieselben Wege wie bei der drogeninduzierten Hämolyse. Die biochemischen Grundlagen der beschleunigten Zerstörung der roten Blutkörperchen werden diskutiert.

Summary

The observation of an acute haemolytic crisis associated with moderate degree of lead poisoning in patient with glucose-6-phosphat dehydrogenase (G-6-PD) deficiency provides the occasion for a comparison of these pathogenetic factors for anaemia. The haematological changes brought about by lead poisoning—haemolysis, disturbance of globin and haem synthesis—and by G-6-PD deficiency are described. It is assumed that lead poisoning does not act as an oxidant on the erythrocyte metabolism as is the case in typical favism, but by the direct blocking of essential sulfhydryl groups. The process of cell destruction follows the same course as with drug-induced haemolysis. The biochemical basis of the accelerated destruction of the red cells is discussed.

Résumé

L'observation d'un malade atteint d'un manque en glucose-6-déshydrogénase et chez lequel une crise hémolytique survient à la suite d'une intoxication au plomb d'un degré moyen, incite à la confrontation du rôle que ces deux facteurs ont joué dans la pathogénie de l'anémie. Les altérations hématologiques causées par le plomb hémolyse perturbation de la synthèse de la globine et de l'hème ainsi que celle causée par le manque de G-6-PD sont décrites. Il semble que le plomb n'intervienne pas dans le métabolisme des érythrocytes en tant qu'agent oxydant, comme est le cas dans le favisme typique mais que les groupes sulfhydryles soient directement bloqués. La destruction des cellules se fait de la même façon que dans les hémolyses médicamenteuses. Les mécanismes biochimiques fondamentaux de la destruction accélérée des érythrocytes sont discutés.

Literatur

2. Bernard, J., Najean, Y., Schaison, G. et T[illegible] J.: Les [illegible] du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase. Bull. Soc. méd. Hôp. Paris 115, 437 (1964)

Bernard, J. et Boivin, P.: L'anémie [illegible] glucose-6-phosphate déshydrogénase. Bull. Soc. méd. Hôp. Paris 11[illegible] 4[illegible]7 (1964)

3. Beutler, E. H., [illegible] and [illegible]: [illegible] of glucose-6-phosphate dehydrogenase [illegible] Proc. Nat. Acad. Sci. 4[illegible]

4. Brewer, G. J., Tarlov [illegible]: The hemolytic effect of primaquine XII. [illegible] J. La[illegible] 58 217 (1961)

5. Brewer, G. J., Powell [illegible] primaquine-sensitive [illegible] J. Lab. clin. Med. [illegible]

6. Carson P. E. [illegible] with [illegible]

Carson P. E. [illegible] G. J. [illegible] Europ. Soc. Haemat. [illegible] (1961) [illegible]

7. Carson P. E. [illegible] phate dehydrogenase [illegible] (1959)

9. Cohen, L. J. [illegible] J. [illegible]

10 Cohen G and Hochstein, P Primaquine induced generation of hydrogen peroxyde in erythrocytes. Blood *20* 785 (1962)
11 Escobar, M. A. Heller, P and Trobaugh, F E. Complete erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency Arch. Intern. Med. *113*. 428 (1964).
12 Fratianne, R. B. Grayson, R. C. and Harris, J W Autosurvival of erythrocytes treated in vitro with lead chlorides. Clin. Res. *7* 384 (1958)
13. Grayson, R. C. and Harris, J W : Erythrocyte survival and heme synthesis in lead poisoning. Clin. Res. 6. 188 (1958)
14 Harris, J W The Red Cell. Production, Metabolism normal and abnormal (Harvard University Press 1963)
15. Heyermann H. H. Ehrler, U und Stecker, G. Chronischer nicht sphärocytärer hämolytischer Ikterus bei völligem Fehlen der Glucose-6-phosphatdehydrogenase Aktivität der Erythrocyten. Klin. Wschr *42*. 1250 (1964)
16. Kirkman, H. N Riley H. D and Crowell, B. B. Different enzymic expressions of mutants of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Proc. Nat. Acad. Sci. *46*. 938 (1960)
17 Löhr, G W Favismus in Linneweh Erbliche Stoffwechselkrankheiten (Urban & Schwarzenberg, München 1962)
18. Löhr, G W und Waller, H. D Zur Biochemie einiger angeborener hämolytischer Anämien. Folia haemat. N F *8* 377 (1963)
19 Löhr, G W und Waller, H. D : Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel. Med. Klin. *57* 1522 (1962)
20. Marks, R. A. and Gross, R. T Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency evidence of differences between negroes and caucasians with respect to this genetically determinated trait. J clin. Invest. *38* 2253 (1959)
21 Mauzerall, D Normal porphyrin metabolism. J Pediatrics *64* 5 (1964).
22 Mohler, D N und Crockett C. C. Hereditary hemolytic disease secundary to glucose-6-phosphat dehydrogenase deficiency Report of three cases with special emphasis on ATP-metabolism. Blood *23*. 427 (1964).
23 Oort M. Loos, J A. and Prins, H. K. Hereditary absence of reduced glutathione in erythrocytes. A new clinical and biochemical entity Vox Sang *6*. 370 (1961)
24 Porter, I H. Boyer, S. H. Watson-Williams, E. J Adam A. Szeinberg, A. and Siniscalco, M. Variations of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different populations. Lancet *I*. 895 (1964)
25. Rapoport S and Schewe, D Mechanism of maintenance and reactivation of the SH-enzymes. Proc. 9th Congr Europ. Soc. Haemat. Lissabon 1963, p. 648 (Karger Basel/New York 1963)
26. Rimon, A. Askenazi, I Ramot B. and Sheba, S. Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects activation by stroma of normal erythrocytes. Biochem. biophys. Comm. *2* 128 (1960)
27 Sano S Th effect of mitochondria on porphyrin and heme biosynthesis in red blood cells Acta haemat. jap. *21* suppl. 2, 337 (1958)
28. Szeinberg, A. Adam, A. Kaplan, V Stern, R. Toledo, R. Zaidman, J and Sheba, C Investigation of the mechanism of nitrofurantoin induced hemolysis in *glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient subjects*. Proc. 9th Congr Europ. Soc. Haemat., Lissabon 1963, p. 637 (Karger Basel/New York 1963)
29 Whittam, R. Transport and Diffusion in Red Blood Cells (Arnold, 1964)

Adresse der Autoren: Dr A. Gansoni und Dr F Rhomberg, Medizinische Univ.-Poliklinik, Basel (Schweiz).

Acta haemat. 34 347 353 (1965)

Department of Clinical Laboratory Sciences and Pathology University of Mississippi Medical Center Jackson, Miss.

The Sickling Phenomenon in a White Male Without Hb S

R. B Thompson P J Rau J Odom and W N Bell

The sickling phenomenon first observed in 1910 (4) is the result of molecular aggregation, long chain polymer formation and tac toid formation within the cell due to the gelling of Hb-S in a reduced state. It had been said that a positive sickle cell preparation test definitely indicates the presence of Hb-S However there are reports (3 7 12) of other abnormal hemoglobins producing a sickle distortion of the erythrocytes. Recently we had the opportunity of studying a fast moving hemoglobin in a 61 year old white male who, despite the absence of Hb-S in his cells demonstrated a positive sickling test with sodium metabisulfate. Because of these findings, the following observations were made.

Methods

Routine hematologic procedures for hemoglobin, hematocrit, red blood count, reticulocyte count, osmotic fragility hemoglobin electrophoresis, and quantitation of the major and minor fractions were performed as outlined in an earlier procedure (12) Through hybridization studies (Shibata et al) (10) and structural studies of Murayama (6), the hemoglobin subsequently designated as Hb-I was identified. The results of these studies will be elucidated in later publication. Solubility studies using the method of Itano (5) were performed and the sickle cell preparation procedure was performed using 3 6, and 9 sodium metabisulfite

Case History

A 61 year old male was admitted to the University of Mississippi Medical Center for evaluation of chronic peptic ulcer of five years duration Physical examination at this time revealed well developed, well nourished whit male with blood pressure 140 80 pulse 68, and temperature 98 6 °F There ere no palpable nodes, liver or spleen

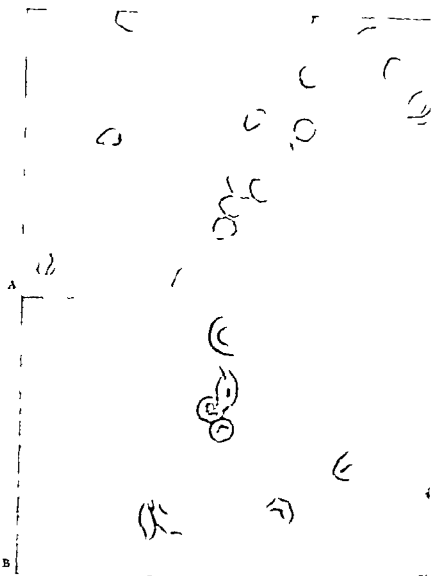


Fig. 1 (A) A sickle preparation procedure on blood of the case under study using 3% sodium metabisulfite after 40 minutes incubation (450×). Frequent bowl and crescent shaped cells are present. (B) A sickle preparation using 6 sodium metabisulfite 20 minutes after incubation (450×).

The pertinent laboratory data was a follo s hemoglobin 16 3 gm hematocrit 50%, RBC 5 380 000/cmm, and reticulocyte count 1% By error a sickle cell preparation procedure with 3% sodium metabisulfite was done and reported as positive (Fig 1A) Hemoglobin electrophoresis (Fig 2) revealed a fast moving compo-



Fig 2 Starch gel electrophoresis pH 8.1 (benzidine stain) on selected hemoglobin hemolysates, (a) thalassemia trait with elevated Hb-A_2, (b) cord blood hemolysate containing Hb-Bart' and H, ( ) Hb-I (case under study) and (d) Hb-A_2-B_2

nent with Hb-A and Hb-A_2. Quantitation of the hemoglobin fractions revealed the fast moving fraction to comprise 27 ⁄ of the total hemoglobin and Hb-A_2 4 8 ⁄ Serum iron was 90 mcg iron binding capacity 295 mcg and osmotic fragility was normal. A Cr^{51} survival revealed a half-life of 20 days (normal 25–33 days) The chest and long bones were normal on X ray examination

Subsequently we were able to study three family generations (Fig 3) including the patient s immediate offspring and were able to identify this fast component in 15 of 22 family members studied In addition, we were able to trace the family ancestory through 6 generations evidence was unearthed showing that the family tree began with a Caucasian Irish male who married an American Seminole Indian.

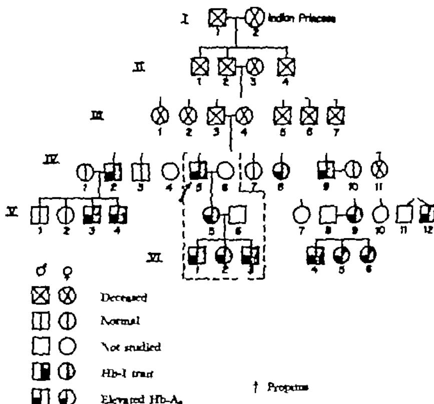


Fig 3. Pedigree of propitus IV 5 (case under study)

Results

If we analyze the hematologic data we see from electrophoresis that the patient possesses a fast moving hemoglobin component with a mobility slightly more anodal than Hb-Bart's. By DEAE cellulose chromatography this fast moving component comprised 20–30 % of the total hemoglobin in the affected family members. Hb-A_2 was elevated in all Hb-I carriers (3.8–4.8 %) and normal in the non affected members.

When the red cells were exposed to 2% sodium metabisulfite the red cells initially became target like or bowl shaped and after 30–60 minutes the characteristic sickle or whisker forms appeared (Fig 1A). The appearance of the cells were so characteristic of classic sickle cells that they passed as a positive sickle preparation on examination by several qualified technicians. Attempts at recov

genation of the treated blood were without effect. The solubility of the hemoglobin in reduced form was 90% as compared to 50 % for Hb-AS

Discussion

The interesting phenomena in the case under discussion are twofold, namely (a) the change in shape of red cells in a manner reminiscent of true sickling when exposed to 3 and especially 6 % sodium metabisulfite and (b) the elevation of Hb-A_2 in view of a normal osmotic fragility

No obvious explanation for the sickling phenomenon could be found but it was supposed as suggested by ATWATER (1) that the sodium metabisulfite was principally responsible for the sickling phenomenon, directly through its action on the red cell membrane. Six per cent metabisulfite enhanced the sickle phenomenon in less time (20–30 minutes) (Fig 1B) no differences were noticed between 6 and 9% solutions. The typical birefringence associated with Hb-S was not present when samples of blood were examined by polarized light. It could not be evaluated on the sickle preparations as sodium metabisulfite exhibits birefringence. Some clumping of hemoglobin was noticed centrally but the characteristic polymerization and tactoid formation seen in sickle cell disease were lacking Thus, it was believed that sodium metabisulfite acted directly on the red cell membrane. ATWATER *et al* (1) reported similar findings in a 25 year old Negro woman but here the percentage of Hb-I was considerably higher than in our cases, namely 70 She postulated since approximately 50% of the dry weight of stroma was made up of solidly bound hemoglobin, that the high concentration of the abnormal hemoglobin in the patient under study may have an effect on the biochemical characteristics of the stroma and might explain its unusual response to sodium metabisulfite. In our case, only about 25 per cent of the stroma was composed of hemoglobin.

The elevation of Hb-A_2 in view of a normal osmotic fragility and a *low normal* cell survival brings up the question *of whether* one is dealing with a double heterozygosity namely Hb-I and beta thalassemia of the type designated by CEPPELLINI (2) as elevated Hb-A_2 without morphologic thalassemia. In Atwater's case, Hb-A_2 values were low or normal while in the case described by RUCKNAGAL (8, 9) and THOMPSON *et al.* (11) Hb-A_2 ranged from 1 7 to 2.5 %

The finding of Indian ancestory in our family is consistent with the finding of RUCKNAGEL AND ATWATER who reported Indian features and a history of Indian ancestory in their family studies. This hemoglobin, an extremely rare variant of human hemoglobin has a considerably lower isoelectric point than Hb-A and an unusually fast electrophoretic mobility at pH 8.1.

Acknowledgements. The authors wish to express thanks to Mr. F. MARCUM for assistance in obtaining blood samples from all available family members, to the Clinical Research Center (Public Health Service Grant GCRC FR 91), to Mr. JAMES GOODMAN and the Department of Medical Illustration and to the secretarial assistance of Miss K. GROWER. This study was supported by N. I. H. Grant (AM-07943-02 (Hem.)

Summary

The sickling of erythrocytes in a 61 year old white male whose hemoglobin electrophoresis disclosed a Hb-hemoglobin A+I pattern with no Hb-S is described. Hb-I comprised 20 to 30% of the total Hb-hemoglobin and Hb-A_2 3.5 to 4.8%. Sickling tests were positive with 3% and consistently positive with 6% metabisulfite. The unusual finding of sickling of red cells despite the absence of Hb-S is believed to be due to an abnormality of the red cell stroma possibly as a result of the sodium metabisulfite on the red cell membrane.

Résumé

La formation d'érythrocytes falciformes chez un homme blanc de 61 ans est décrite. L'électrophorèse mit en évidence une combinaison d'hémoglobine A+I, sans hémoglobine S. L'hémoglobine I comprenant 20 à 30% de l'hémoglobine totale et l'hémoglobine A_2 3,5 à 4,8%. Les tests de formation d'érythrocytes falciformes étaient positifs avec une solution de 3% de métabisulfite et tout spécialement à une concentration de 6%. La formation inhabituelle d'érythrocytes falciformes en l'absence de Hb-S est attribuée à une anomalie du stroma des érythrocytes et est peut-être le résultat de l'effet du métabisulfite de sodium sur la membrane des érythrocytes.

Zusammenfassung

Es wird über die Bildung von Sichelzellen berichtet bei einem 61 Jahre alten Mann, bei dem die Hämoglobinelektrophorese eine Kombination von Hb A und Hb I jedoch kein Hb S ergab. Das Hb I betrug 20 bis 30%, das Hb A_2 3,5 bis 4,8% des gesamten Hämoglobins. Der Sichelzelltest fiel positiv aus mit 3% und regelmäßig mit 6% Metabisulfit. Der ungewöhnliche Befund einer Sichelzellbildung trotz Fehlens von Hb S kann durch eine Anomalie des Erythrozytenstromas bedingt sein, vielleicht auch durch einen Einfluß des Metabisulfit auf die Erythrozytenmembran.

References

1. Atwater, J.; Schwartz, R. I.; Erslev, A. J.; Montgomery, T. L. and Tocantins, L. M.: Sickling of erythrocytes in [illegible] patient with thalassemia Hb-I disease. New Engl. J. Med. 263: 1215 (1960).
2. Bannerman, R. M.: Thalassemia. A survey of some aspects. p. 53 (Grune and Stratton, New York 1962).
3. Eng, L. I. L.: Hemoglobin 'Bart's' and the sickling phenomenon. Nature *191*: 1314 (1961).
4. Herrick, J. B.: Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in [illegible] case of severe anemia. Arch. Int. Med. 6: 517 (1910).
5. Itano, H. A.: Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobins. Arch. Biochem. 47: 148 (1953).
6. [illegible]ama, M.: Peptide patterns: fingerprinting of hemoglobin. Applied Seminar on Clinical Pathology of Hemoglobin, Its Precursors and Metabolites. Washington, D. C. Assoc. Clin. Sci. 1962.
7. Pierce, L. E.; Rath, C. E. and McCoy, K.: A new hemoglobin variant with sickling properties. New Engl. J. Med. 268: 862 (1963).
8. Page, E. B.; Rucknagel, D. K. and Jensen, W. N.: Clinical and genetic studies of [illegible] new inherited abnormality of hemoglobin characterized by [illegible] rapid electrophoretic mobility. Clin. Res. Proc. 3: 67 (1955).
9. Shibata, S.; Iuchi, I.; Sakurai, U.; Miyaji, T. and Takeda, I.: Agar gel electrophoresis of the hybrid of canine and human hemoglobins. A simple convenient means for the determination of the chain anomaly. Acta Haematol. Japonica. 25: 675 (1962).
10. Thompson, O. L.; Moreland, H. J.; Smith, G. W.; Bowman, B. H.; Alexander, M. J. and Schneider, R. G.: A family with Hb-L. Blood 22: 313 (1963).
11. Thompson, R. B.; Mitchener, J. W. and Huisman, T. H. J.: Studies on the foetal hemoglobin in the Persistent High Hb-F anomaly. Blood *18*: 267 (1961).
12. Thompson, R. B. and Holloway, C. H.: Observations on the sickling phenomenon. Amer. J. Med. Tech. 29: 379 (1963).

Authors' address: Drs. R. B. Thompson, P. J. Ross, J. Odom and W. N. Bell, Dept. of Clin. Lab. Science and Pathology, Univ. of Mississippi Med. Center, Jackson, Miss. (USA)

Acta haemat. 34 354–360 (1965)

From the Department of Pediatrics, Medical School of Ankara University Ankara, Turkey and the Department of Internal Medicine Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

A Further Example of Thalassemia Hemoglobin E Disease in Turkey

A. Okçuoğlu Virginia Minnich and A. Arcasoy

Hemoglobin E was first described independently from two laboratories in 1954 (9 13) This new hemoglobin was found to be most characteristic for people from the Far East (2, 5 7) However since then it has been observed infrequently in other parts of the world (2, 5)

Hemoglobin E has been encountered in 4 forms 1 the heterozygote form in combination with normal hemoglobin A, 2 in the homozygote state (17) 3 in association with the genes for both alpha and beta thalassemia (19) 4 and in combination with hemoglobin S (3 11)

Thalassemia hemoglobin E disease appears when the genes for thalassemia and hemoglobin E are combined in the same person. Usually one parent is a carrier for the thalassemia gene and the other for hemoglobin E. Like hemoglobin E, thalassemia-hemoglobin E disease has its highest frequency in the Far East, particularly in Thailand (7 9)

The purpose of this report is to describe the first case of thalassemia hemoglobin E disease in Eti Turks. This is the second report of this disease from Turkey

Methods

Routine hematological methods were employed. Fetal hemoglobin was determined by the alkali denaturation method of Singer et al. (18) Starch block electrophoresis was done by Kunkel method (14) using both Turkish starch (15) and starch obtained from America.

Case History

S. Y 6 years old girl from Adana was admitted to the hospital with the history of high fever pallor and chills of 10 days duration. Her family belonged to the ethnic

Table I

Hematologic data in the family with thalassemia-hemoglobin E disease.

	Hb %	RBC 10^6/mm³	Hct %	WBC mm³	Retic. %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %	NRBC /100 WBC
Patient	5.3	3.87	18	10,400	2.0	47	14	30	2
Mother	13.8	6 00	38	8,840	1.6	64	23	36	0
Father	14 0	7 72	45	8,400	0.8	64	20	31	2

Table I (continued)

	Anem.	Poik.	Hypo.	Target cells	Sphero.	Serum iron μg %	TIBC^a
Patient	++++	++++	++++	++	++	73	343
Mother	+	+	+	+	+	—	—
Father	+	++	++	0	0	—	—

Total iron-binding capacity

Table II

Hemoglobin analyses in the family with thalassemia-hemoglobin E disease.

Members of the family	Sex	Age, yrs.	Hemoglobin A, %	Hemoglobin E, %	Hemoglobin A_2	Hemoglobin F %
Patient	F	6	11.8	78.2	—	10 0
Mother	F	34	75.0	25 0	—	0.9
Father	M	37	92.7	0	4.7	2.9
Sibling	F	8	67.0	32.0	—	1.0
Sibling	F	11	93.0	0	5.8	1.2
Sibling	F	4	73.0	27.0	—	—
Sibling	F	9	67.8	31.0	—	1.2
Sibling	M	14	96 8	0	3 2	0.8

0- Not present Not done

group of Eti-Turks. She was noted to have [an] intermittent abdominal pain and darkness in the urine during the last 2 years.

Physical examination revealed [a] fairly well developed and well nourished girl, with pallor and muddy color. There was no mongoloid facies nor were gross skeletal changes seen as in thalassemia major. The liver was palpated 5 cm below the right costal margin and the spleen was enlarged 2 cm below the left costal margin. no petechiae or obvious jaundice were noticed. The hematological data are shown in Table I. The hemoglobin analyses on the entire family is summarized in Table II. Bone marrow examination revealed normal cellularity with [a] slight increase in erythroid elements. Iron granules were found to be present with Prussian blue stain, erythroid hyperplasia was not as marked as would be expected in severe hemolytic anemia. This last finding was thought to be due to superimposed infection. X-ray studies revealed only trabecular striation in bones and minimal cardiomegaly. Liver function tests, serum total proteins were within normal limits as was the Coombs test.

In view of her daily fever spike and chills, malaria, kala-azar, typhoid fever and brucellosis were searched for by appropriate studies but only [a] positive test for brucella was found. She was treated with antibiotics and transfusions [to] which she responded well.

Discussion

The hematological and genetic findings are compatible with the diagnosis of thalassemia hemoglobin E disease in this girl. The pedigree studies (Fig 1) revealed that the father had classical thalassemia minor with elevated hemoglobin A_2 and the mother was a carrier for hemoglobin E. Furthermore, three siblings were heterozygous for hemoglobin E, one for thalassemia and one was normal.

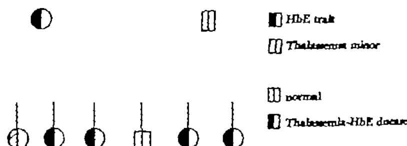


Fig 1 Family with thalassemia hemoglobin E disease.

The marked variability of the symptom complex associated with thalassemia hemoglobin E disease is well known (10) Our case seems to represent a moderately severe form of the syndrome as signs of impaired health and transfusion requirement did not appear until 6 years of age Lack of growth retardation and changes in skelatal system is also in favor of the moderate form Thalassemia —hemoglobin E disease, however may easily be confused with COOLEY's anemia or any other of the thalassemia hemoglobin disorders, as the clinical and routine hematologic manifestations are not sufficiently distinctive (11) Therefore, the electrophoretic studies still remain the most important tool for diagnosis.

The patient's blood picture was characterized by a severe hypochromic microcytic anemia. Reticulocytes were found to be only slightly elevated perhaps superimposed infection of brucella may have accounted for this. Nucleated red cell, target cells, and spherocytes were also observed as has been described previously in this disease (10)

Hemoglobin analysis (Fig 2, 3) revealed that the father had an elevated hemoglobin A_2 to 4 7% and slight rise in fetal hemoglobin to 2.9% The mother's hemoglobin consisted of 25 % hemoglobin E

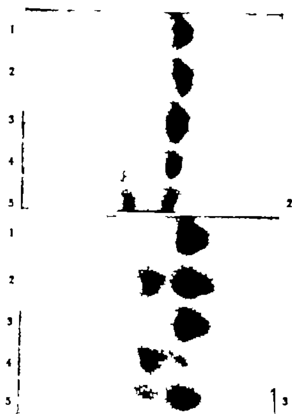


Fig 2. Starch block electrophoresis using Turkish starch.

1. Brother of the patient, normal
2. Sister of the patient, thalassemia minor (elevated A_2)
3. The father thalassemia minor (elevated A_2)
4. Sister of the patient, hemoglobin E trait (A E)
5. Sister of the patient, hemoglobin E trait (A E)

Fig 3. Starch block electrophoresis (American Starch) pH 8.6.

1. Normal
2. The mother hemoglobin E trait (A E)
3. The father thalassemia minor (elevated A_2)
4. The patient, hemoglobin E and A + F
5. A E control

and the remainder was hemoglobin A. The majority of the patient's hemoglobin was hemoglobin E, 78.2 Hemoglobin F by alkali denaturation accounted for 10 of the total. This value is moderately low for thalassemia hemoglobin E disease but it is com-

parable to the values reported by other investigators (7) Hemoglobin A in our patient was calculated from the amount of A+F determined on starch block electrophoresis minus the alkali denaturation value. As has been reported previously hemoglobin A may be present in small amounts in cases of thalassemia—hemoglobin E disease (7)

It is of interest that the patient belonged to an ethnic group so-called Eti-Turks, who are generally located in the southern part of Turkey They represent a population with the highest incidence of hemoglobin S (16.8 %) in the white race (4) The thalassemia gene has also been encountered infrequently in this community (2) Cases with thalassemia minor and major have been described from this region (1) Because of the higher incidence of hemoglobin S occurence of hemoglobin S-thalassemia disease was more frequently observed in this group in the forms of sickle cell-alpha thalassemia and sickle cell beta thalassemia combinations (8 7)

However the incidence of hemoglobin E in Eti Turks was low 1.37% (2, 3) therefore, one would expect fewer cases of thalassemia hemoglobin E disease than that of thalassemia-hemoglobin S combination. In fact, the case presented herein is the first of thalassemia hemoglobin E disease among Eti Turks. The previous reported cases from this country were observed in Turkish immigrant families from Greece (7) The only other family of thalassemia hemoglobin E disease not related to the Far East has been reported by GOUTTAS *et al.* in Greece (12)

Summary

Thalassemia-hemoglobin E disease is described in 6 years old girl of Eti-Turks. The patient displayed moderately severe form of the disease and had an associated infection of brucellosis. The genetic studies revealed that the father had classical thalassemia minor and the mother was carrier for hemoglobin E. Three siblings ere found to be heterozygous for hemoglobin E, one for thalassemia and one was normal. This is the first report of thalassemia-hemoglobin E disease in Eti-Turks and the second from Turkey

Résumé

Nous rapportons le cas d'une fillette étiturque agée de six ans atteinte d'une thalassémie combinée à une maladie d'hémoglobine E. La malade avait une forme modérément grave de cette maladie et était en même temps atteinte d une brucellose.

Les études génétiques démontrèrent que le père avait une thalassémie mineure classique et que la mère était porteuse du trait d'Hb-E. Trois frères et sœurs étaient hétérozygotes quant à l'hémoglobine E, un l'était quant à la thalassémie et un autre était normal. Il s'agit du premier rapport de maladie Hb-E et de thalassémie combinées chez des éti-turques et du deuxième cas en Turquie.

Zusammenfassung

Es wird über eine Kombination von Thalassämie und Hämoglobin-E-Krankheit bei einem 6 Jahre alten Mädchen eti-türkischer Abstammung berichtet. Das Kind wies eine mittelschwere Form der Krankheit auf und hatte gleichzeitig eine Brucellose. Die genetischen Untersuchungen ergaben, daß der Vater eine klassische Thalassaemia minor hatte und die Mutter Trägerin des Hb-E-Merkmals war. Drei Geschwister waren heterozygot für Hb E, eines für Thalassämie und eines war normal. Es ist dies die erste Mitteilung einer Thalassämie-Hämoglobin-E-Krankheit bei einem eti-türkischen Patienten und der zweite Fall in der Türkei.

References

1. Aksoy, M.: Sickle-cell anemia in south Turkey: A study of fifteen cases in twelve white families. Blood *11*: 460 (1956).
2. Aksoy, M.: The hemoglobin E syndromes I. Hemoglobin E in Eti-Turks. Blood *15*: 606 (1960).
3. Aksoy, M.: The hemoglobin E syndromes II. Sickle cell-hemoglobin E disease. Blood *15*: 610 (1960).
4. Aksoy, M.: Hemoglobin S in Eti-Turks and the Alewits in Lebanon. Blood *17*: 657 (1961).
5. Aksoy, M.: Hemoglobins S and E in Turkish people. Nature *193*: 786 (1962).
6. Aksoy, M.: The first observations of homozygous hemoglobin S-alpha thalassemia disease and two types of sickle cell thalassemia disease: a) Sickle cell-alpha thalassemia disease; b) Sickle cell-beta thalassemia disease. Blood *22*: 757 (1963).
7. Aksoy, M.; Çetingil, A. I.; Kocabalkan, N.; Seyrakov, D.; Aladağ, T.; Saçer, F. and Bostancı, N.: Thalassemia-hemoglobin E disease in Turkey with hypersplenism in one case. Amer. J. Med. *34*: 851 (1963).
8. Aksoy, M. and Lehmann, H.: Sickle cell thalassemia disease in south Turkey. Brit. med. J. i: 734 (1957).
9. Chernoff, A. I.; Minnich, V. and Chongchareonsuk, S.: Hemoglobin E, hereditary abnormality of human hemoglobin. Science *120*: 605 (1954).
10. Chernoff, A. I.; Minnich, V.; Na-Nakorn, S.; Tuchinda, S.; Kashemsant, C. and Chernoff, R. R.: Studies on hemoglobin E. Blood *11*: 455 (1956).
11. Dacie, J. V.: The Hemolytic Anemias, p. 271 (Churchill, London 1963).
12. Goutzas, A.; Thevenin, H.; Roussos, C.; Papapetrou, A. et Gardikas, M.: L'hémoglobine E en Grèce. Sang *31*: 1 (1960).
13. Itano, H. A.; Bergren, W. R. and Sturgeon, P.: A fourth abnormal hemoglobin. J. amer. chem. Soc. *76*: 2278 (1954).
14. Kunkel, H. G. and Wallenius, G.: New hemoglobin in normal adults blood. Science *122*: 288 (1955).

15. Minnich, V. Arcasoy A. and Okçuoğlu, A. The use of Turkish starch for hemoglobin electrophoresis (to be published)

16. Na-Nakorn, S. Minnich, V. and Chernoff A. I. Studies on hemoglobin E II The incidence of hemoglobin E in Thailand. Blood *47* 490 (1956)

17 Na Nakorn, S. and Minnich, V.: Studies on hemoglobin E III Homozygous hemoglobin E and variants of thalassemia and hemoglobin E. A family study Blood *12*. 529 (1957).

18. Singer, K.; Chernoff A. I. and Singer, L.: Studies on abnormal hemoglobins I. Alkali denaturation. Blood *6*. 413 (1951)

19. Tuchinda, S. Rucknagel, D. L. Minnich, V. Boontaprakob, U. Balankura, K. and Suvatee, V. The coexistence of the genes for hemoglobin E and alpha thalassemia in Thais, with resultant suppression of hemoglobin E synthesis. Amer. J. human Genet. *16*. 311 (1964)

Authors' addresses: Drs. A. Okçuoğlu and A. Arcasoy, Dept. of Pediatrics, Med. School of Ankara University *Ankara* (Turkey); Dr. V. Minnich, Dept. of Internal Medicine, School of Medicine Washington University *St. Louis, Mo.* (USA).

Acta haemat. 34 361-369 (1965).

Department of Therapeutics, the Royal Infirmary Edinburgh

A Case of Autoimmune Haemolytic Anaemia, Thrombocytopenia and Landry Guillain Barré Syndrome

F. A. Ala and D. J. C. Shearman

In recent years there has been a tendency to attribute diseases of unknown aetiology to disorders of immune tolerance. One such condition is known as Landry-Guillain-Barré syndrome (20, 23) although the evidence for the inclusion of this condition in the lists of autoimmune diseases is for the most part inconclusive (6, 19). It is the purpose of this paper to report the occurrence of what we considered to be the Landry-Guillain-Barré syndrome in a patient known to be suffering from idiopathic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. The onset of warm antibody autoimmune haemolysis in a patient who has previously had splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura is, in itself, very uncommon (10, 12, 25, 29). The occurrence of this particular neurological syndrome in such a richly varied context of 'self' intolerance lends support to the theory that it also is a disorder of autoimmune aetiology.

Case Report

Thrombocytopenia. The patient, G. S. (born in 1925) first developed purpura and bruising in May 1945. The purpura was widespread and acute but resolved within week. In 1949 he was admitted to another hospital with haematuria, bleeding gums and extensive bruising and purpura of one week' duration. Haemoglobin was 11.7 g% platelets less than 10,000/mm³ and WBC 3,400/mm³ with normal differential count. Hess' test was negative but the bleeding time was over 20 min. A marrow smear showed megakaryocytic hyperplasia. 1 May 1949 splenectomy was carried out. The spleen was roughly assessed as being enlarged to twice the normal size but it was histologically normal. He made an excellent recovery and no further bleeding tendency was noted, although post-operative rise in platelets did not take place. In February 1956, he was first admitted to the care of Prof. Sir D. Dunlop in the Royal Infirmary, Edinburgh, with recrudescence of thrombocytopenia and an extensive purpuric rash on both legs. Platelets were found to be 40,000/mm³. Cortisone acetate, 300 mg/day relieved the purpura but his platelet count fel

Pre-sacral air insufflation demonstrated no spleniculi and platelet agglutination studies were negative. He was discharged in September 1956, with a strongly and persistently positive faecal occult blood platelets were 20,000 mm³ By July 1958, platelets had risen to 330,000 mm³ and cortisone was stopped.

Onset of haemolysis: The patient was readmitted to hospital in September 1958, with pallor and jaundice which followed a week of increasing tiredness, sweating and nausea. The liver edge was tender and enlarged two fingers' breadth below the right costal margin. Haemoglobin was 8.5 g% serum bilirubin 2.9 mg% and the urine showed much urobilinogen. Direct Coombs' test was strongly positive. The platelet count was 425,000 mm³ and remained normal thereafter Three days later his haemoglobin dropped catastrophically to 2.5 g% and he was transfused with 27 pints of packed cells over the next three weeks. Prednisone 60 mg and intravenous hydrocortisone 300 mg were administered daily and he gradually improved. Within a month the haemoglobin level was maintained at 13.1 g% on 10 mg of prednisone daily

The neuropathy On 20th December 1958, he first developed increasing weakness of the lower limbs which was more marked on the left side. He walked on broad base with waddling' gait. Weakness progressed rapidly and by January 8th, 1959, he had lost all tone in the muscles supplied by L5-S1 and was unable to stand. Knee jerks were weak and ankle jerks were absent. Bladder and bowel function was normal. There was no subjective disturbance of sensation and examination demonstrated no sensory deficit. The CSF showed protein 250 mg/100 ml, 5 cells per mm³ with normal pressure and dynamics. Myelography showed no cord compression. Wasting of muscles was minimal and by February 1959 a gradual return of movement began. Thereafter he made a complete ecovery with full return of power and function and in October he returned to work.

Two years later in March, 1961 a further episode of neuropathy brought him back to hospital. He had experienced spreading numbness and tingling of the left leg, which soon involved the right lower limb. Both legs became increasingly weak and they would not support him. On examination there was profound weakness of the hip flexors and abductors, hamstrings, lateral peroneal and left extensor hallucis longus but no wasting of the muscles. Paraesthesiae appeared to be localised to the L5-S1 territory but there was no proprioceptive or extroceptive deficit and X-rays of this region were normal. Knee jerks were very brisk and there was bilateral sustained ankle clonus. Both plantar responses were extensor The nervous system was otherwise normal. Several preparations for LE cells were negative and there was no evidence of nephropathy The serum B_{12} was 255 $\mu\mu g$/ml. The CSF protein was 58 mg% lymphocytes 23 mm³ and dynamics were normal. A collagenosis with arteritis and occlusive cord damage was still considered the most likely diagnosis and prednisone was consequently given at dose of 30 mg/day

By April, 1961 weakness had improved although the legs were spastic and both plantars were extensor There was a slight increase in weakness three weeks later The CSF protein level was 114 mg%, lymphocytes 20 mm³ WR negative and colloidal gold test 1122212200. Serum protein electrophoresis gave a total protein of 6.7 g% 3.6 g% albumin globulins alpha₁ 0.3 g% alpha₂ 0.8 g% beta 1.0 g% and gamma 1.0 g%. The blood count showed total WBC of 3,000 mm³ with 64% lymphocytes, majority of which were atypical. The Paul Bunnell test was not done. Power gradually returned to both legs and by June, 1961 he was able to walk with sticks. CSF protein subsided to a level of 50 mg% but the abnormal neurological signs persisted. Prednisone was reduced to 10 mg daily In November there was only residual ataxia and spasticity but the plantars remained extensor until February 1962.

Relapse of haemolysis: Early in December 1963, this patient was readmitted with severe biliary colic and vomiting There was bilirubinuria and the haemoglobin level

had dropped to 10.7 g%. In retrospect it was at this point that an upper lobe opacity first appeared in the right lung which subsequently proved to be tuberculous. Abdominal symptoms were transient and he continued in reasonable health until March, 1964 when his haemoglobin fell to 8,0 g%. Gross urobilinogenuria was present and reticulocytes were 12 %. ESR 110 mm in the first hour platelets 240,000 mm. A blood film showed polychromasia and anisocytosis, 80 normoblasts per 100 white cells, few myelocytes, numerous microspherocytes and many red cells containing Howell-Jolly bodies. Haptoglobins were absent and the T½ ⁵¹Cr of red cells was 16 days (normally 25–35 days). The direct Coombs' test was positive to titre of 1 1280 and the reaction was neutralised by the addition of gamma-globulin. The blood group was AB with probable Rh genotype of CDe/cDE. His cells showed autoagglutination which was most marked at room temperature, at 37 °C and weak at 4 °C. This was consistent with the coating of red cells by antibodies of the 'warm' type. By the enzyme technique his serum agglutinated all of large panel of cells and no certain evidence of blood group 'specificity' was detected. By the indirect Coombs' test, however the serum was compatible only with cells of the Rh genotype CDe/CDe reacting specifically with cells possessing and E antigens. An eluate prepared from his red cells gave identical reactions.

Steroids were increased to 60 mg prednisone daily and the haemoglobin varied between 9.2 and 10.7 g% with reticulocytosis of 6 to 12 % until June, 1964.

Towards the end of June, 1964 he was readmitted with recrudescence of haemolysis. Blood group specificity could no longer be discerned by the indirect Coombs' test or by cell elution. Haptoglobins were paradoxically present and they remained so throughout July in the presence of brisk haemolysis. Pneumomediastinography (400 cm O_2 by the retrotracheal method) showed no discernible thymic tissue. His haemoglobin fell to 5.1 g% and there ensued desperate two-and-a-half month period of extremely severe haemolysis. I the course of these 10 weeks, he received total of 100 units of packed cells—an average of 1.25 units daily. Red cell survival estimated at intervals in this period (⁵¹CrT½) was 22, 24 and 25 h. At no time was free haemoglobin demonstrated in plasma or urine and Schumm's test for methaemalbumin was persistently negative.

Imuran and Actinomycin C were administered on 20th July 1964. These drugs were discontinued on 6th August, 1964 when WBC dropped to 1 423 mm³ (corrected for normoblasts) although the platelet count remained normal. Haemolysis continued quite unabated during this time. Red cell destruction was uninfluenced by large doses of prednisone and by transfusion of cells washed and warmed to 37 °C before infusion.

A persistent cough had developed in the course of July and opacification in the right upper zone was noted on chest X-ray. In August, sudden pleuritic pain in the left axillary region with haemoptysis and pyrexia were attributed to pulmonary embolism and infarction, and he had left deep venous thrombosis. Chest X-ray showed large cavity in the anterior segment of the right upper lobe and numerous tubercle bacilli were seen on Ziehl-Nielson film of sputum. Full antituberculous chemotherapy was initiated on the 24th August, 1964 (streptomycin 1G, PAS 10G, INAH 300 mg/day). The serum haptoglobin level was shown to be grossly increased at this stage to 300 mg% in spite of very severe haemolysis.

Two weeks of antituberculous treatment initially failed to alter his voracious transfusion requirements and second course of treatment with Imuran was started on 9th September. T½⁵¹ Cr was 25 h this time. On the 13th September the dose of prednisone was increased to 100 mg/day and red cell destruction gradually subsided over the ensuing three to four weeks. The last blood transfusion was given on the 18th September and, thereafter there was steady fall in reticulocyte count and serum bilirubin, accompanied by a sustained rise in the haemoglobin level. Imuran was dis-

continued on the 23rd September 1964. On the 27th September 1964 $T\frac{1}{2}$ ^{51}Cr was 33 days and on October 10th it was 23 days. The direct Coombs' remained persistently positive to a titre of 1 640 and the indirect Coombs' was positive.

In the course of a final admission, 6 weeks later when biliary colic and mild recurrent haemolysis were diagnosed, the patient complained of severe breathlessness and chest pain. He collapsed and died soon after Autopsy showed that the immediate cause of death was massive pulmonary arterial thromboembolism. There was evidence of repeated previous pulmonary embolism. The heart was normal and atheroma was minimal in the major arteries. The brain and spinal cord were carefully examined and showed no evidence of arteritis or thromboembolism. The nerve roots at all levels appeared normal. The peripheral nerves were not examined. The only positive finding was of some degeneration in the columns of Goll at the cervical level.

Discussion

1 CNS findings The first episode of neuropathy was a circumscribed, purely lower motor neurone paresis associated with a high CSF protein the second, a progressive spastic paresis with extensor plantar responses, occurring in the same segmental distribution and accompanied by paraesthesiae and raised CSF protein. Both episodes were afebrile and self limiting and complete resolution of signs and symptoms eventually took place.

Spinal vascular occlusion might reasonably be invoked, particularly in view of the subsequent history of repeated deep venous thrombosis with pulmonary emboli. Reference has been made by Dreyfus *et al.* (14) and Young *et al.* (30) to the frequency of superficial and deep thrombophlebitis accompanying intense haemolysis. Christen *et al.* (8) also noted ischaemic ECG changes in similar cases which they attributed to microthrombi formed by agglutinated erythrocytes. Haemolysis was in abeyance, however in the course of both neuropathic episodes. The possibility of polyarteritis or systemic lupus was seriously considered but the complete neurological recovery and the prolonged history of 19 years without emergence of other characteristic features was against a diagnosis of collagen disease with angiopathy In addition, a fruitless search for anti nuclear factor and LE cells was undertaken during life and at post mortem no evidence of 'vasculitis' was found. Unique in literature is a case of acquired autoimmune haemolytic anaemia (14) who developed neurological phenomena bearing a remarkable resemblance to those of this patient. A three year progressively deepening spastic paraparesis with dorsiflexor plantar responses and paraesthesiae, regressed entirely after splenectomy which also

brought an end to haemolysis. Arteritis and vascular thrombosis would be most unlikely aetiological factors here.

A more likely possibility in this case is a Landry-Guillain-Barré syndrome. A progressive ascending weakness and CSF albumino-cytological dissociation are very suggestive. The virtual absence of positive findings on neuropathological examination lend further support to this diagnosis. Spasticity and extensor plantar responses are not commonly associated with Guillain-Barré syndrome although their occurrence in this condition is well documented. J. A. BARRÉ (3) refers to spasticity in a number of cases and BAKER (2) DE MORSIER AND STEINMANN (13) POLAN AND BAKER (24) CASAMAJOR AND ALPERT (7) and COMA *et al.* (9) record extensor plantar responses in this syndrome. Further although histopathological changes in the CNS are less common than lesions of peripheral nerves and anterior horn cells there are a number of writers who have noted diffuse or patchy demyelination in pyramidal tracts and posterior columns (18) It is not uncommon for sensory signs and symptoms to be entirely absent or manifested only as paraesthesiae which may be circumscribed and segmental in distribution (15)

The propositus had a lymphocytosis of 84 / (total white blood count 5,000 mm³) with numerous atypical mononuclears in the course of his spastic neuropathic illness. A test for heterophil anti bodies was not carried out, although it is unlikely that he was suf fering from infectious mononucleosis in that there were two distinct and widely separated episodes of neuropathy

PARSONAGE AND TURNER (22) have noted neuropathies very close to Landry-Guillain-Barré syndrome occurring in allergic states after serum therapy and vaccines and WAKSMAN AND ADAMS (27 28) have produced a similar neurological disorder in animals by inducing allergy' by the injection of spinal cord and peripheral nerve extracts with Freund's adjuvant. In brief, it is *possible* that the appearance of atypical mononuclears and the Landry-Guillain-Barré syndrome are both associated manifesta tions of an allergic state.

The autoimmune basis of this syndrome is still far from secure and demonstration of antibodies is still required to complete the evidence in its favour but the work of WAKSMAN AND ADAMS (27 28) ÅSTRÖM AND WAKSMAN (1) and MELNIC (20) suggests that this is a feasible postulate.

Although it is not possible to prove our contention conclusively we feel this patient's neuropathy can be placed within the same frame of reference as his thrombocytopenia and haemolytic anaemia and that he represents an example of multiple autoimmunity This also provides some support for the concept of Landry-Guillain-Barré as an autoimmune disorder

2 *Haptoglobins* It has been noted that the serum haptoglobin level in this patient was grossly elevated at 300 mg / when haemolysis was at its peak yet it has been estimated that only 3 g of haemoglobin will normally saturate circulating plasma haptoglobins (17) Assuming 1 1 of blood to contain 150 g of haemoglobin, it will be seen that a very minor degree of cell destruction will quickly clear haptoglobins from the circulation.

There are a number of possible explanations for this apparent paradox Brus and Lewis (5) showed that treatment with steroids caused a progressive rise of haptoglobins in haemolytic states and this rise could not be accounted for by diminution in the rate of cell destruction. Further it is well known that infective and non infective inflammatory states are associated with an elevation of alpha$_2$ globulin levels, which are partly due to increased haptoglobins. Among the inflammatory states giving rise to increased haptoglobins, tuberculosis has been particularly implicated by Jayle *et al.* (16) The rapid inflation of a large tuberculous cavity in this patient corresponds with his highest haptoglobin level. We presume that the increased haptoglobin was due to a combination of these several elements of stress, infection and steroid administration. The persistent absence of methaemalbumin and free haemoglobin in plasma must be explained by the immense haptoglobin excess which was present in spite of gross haemolysis.

3 *Therapy* Although the ultimate prognosis of autoimmune haemolysis with warm antibodies is poorer than in those of the cold antibody type (11) the former group almost always responds to steroid therapy whereas the latter frequently fails to benefit from these drugs. The patient exemplifies this general observation but his refractoriness to conventional doses of steroids in the course of two widely separated episodes of intense haemolysis emphasises the need for persisting with very large doses for an adequate period of time. The number of drugs simultaneously employed during this patient's most recent and severe haemolytic episode makes it difficult to accord therapeutic credit with impartiality In view of

previous papers reporting the successful treatment of similar cases with cytotoxic drugs (26, 25) we gave Imuran, 150 mg daily together with Actinomycin C (250 μg weekly by intravenous infusion) in August, 1964. Indeed, a recent report describes the successful use of a cytotoxic drug in Guillain-Barré Syndrome itself (21). These drugs were discontinued after three weeks because of granulocytopenia but a second course of Imuran alone, 150 mg daily was commenced a month later for a period of roughly two weeks. Because of our inability to influence headlong haemolysis in the course of the first regime with these drugs, it is doubtful that the second course of Imuran played any part in terminating haemolysis.

It is remarkable how closely the recrudescence of a dormant haemolytic anaemia coincides with the appearance of radiological evidence of active tuberculosis in December 1963. Respiratory infections are well known to initiate haemolytic relapse in these patients (4) but tuberculosis has rarely been incriminated. DREYFUS *et al.* (14) describe two cases from a series of eight and DACIE (11) found only two of 101 personal cases where tuberculosis was similarly associated with warm antibody autoimmune haemolysis. Our feeling is that control of infection with four weeks intensive antituberculous chemotherapy (during which sputum became negative and chest radiographs showed striking improvement) combined with a sharp increase in prednisone intake (from 30 mg to 100 mg per day) must ultimately be held responsible for improvement. Reduction in red cell destruction began 6 days after the boost in steroid dosage. The failure of response to moderately large doses (up to 80 mg daily) of corticosteroids and cytotoxic drugs earlier in 1964 may have been due to the presence of uncontrolled and as yet undiagnosed infection.

Acknowledgements. We wish to thank Prof. R. H. GIRDWOOD for his permission to publish this case. Our thanks are also due to Dr [illegible] for estimating haptoglobin levels and to Dr I. W. DELAMORE for his advice in the preparation of this paper. At the time of this study one of us (F.A.A.) was in receipt of a Wellcome Trust Research Grant.

Summary

A case is described of idiopathic thrombocytopenic purpura followed by the occurrence of the Guillain-Barré syndrome and autoimmune haemolytic anaemia. It is suggested that the patient was suffering from multiple diseases of an autoimmune nature and it is postulated that the occurrence of the Landry-Guillain-Barré syndrome

in such a patient lends support to the autoimmune theory of its aetiology. The haemolytic anaemia failed to respond to cytotoxic drugs and the reasons for this are discussed.

Résumé

Un cas de purpura thrombocytopénique idiopathique suivi de l'apparition d'un syndrome de *Guillain-Barré* et d'une anémie hémolytique par auto-immunisation est rapporté. Il se pourrait que ce malade ait été atteint de plusieurs maladies auto-immunologiques. La présence d'un syndrome de Landry-Guillain-Barré chez un tel malade semble étayer la théorie d'une étiologie auto-immunologique. L'anémie hémolytique n'a pas réagi à l'administration de médicaments cytotoxiques. Les raisons en sont discutées.

Zusammenfassung

Es wird über einen Fall von idiopathischer thrombocytopenischer Purpura berichtet, bei dem ein Guillain-Barré-Syndrom und eine durch Autoantikörper bedingte hämolytische Anämie auftraten. Es wird vermutet, dass dieser Patient mehrere Autoimmunkrankheiten aufwies. Die Beobachtung bildet eine Stütze für die Theorie, wonach das Guillain-Barré-Syndrom durch eine Autoimmunisierung hervorgerufen wird. Die hämolytische Anämie liess sich durch zytotoxische Medikamente nicht beeinflussen. Die Gründe hiefür werden diskutiert.

References

1 Åström, K. E. and Waksman, B. H.: The passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis and neuritis with living lymphoid cells. J. Path. Bact. 83: 89 (1962).
2. Baker, A.B.: Guillain-Barré's disease (encephalo-myelo-radiculitis): review of 33 cases. Lancet 63: 384 (1943).
3. Barré, J. A.: Association de déficit central au déficit de type périphérique dans le syndrome polyradiculo-névrite avec dissociation albumino-cytologique. Rev. neurol. 75: 251 (1943).
4. Britton, C. J. C.: Disorders of the blood. Ed. Whitby, Sir Lionel E. H. and Britton, C. J. C. 9th ed., p. 537 (Churchill, London 1963).
5. Brus, I. and Lewis, S. M.: The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. Brit. J. Haemat. 5: 348 (1959).
6. Campbell, A. M. G.: The aetiology of polyneuritis. Proc. roy. Soc. Med. 51: 157 (1958).
7. Casamajor, L. and Alpert, G. R.: Guillain-Barré Syndrome in children: review of literature and report of three additional cases. Amer. J. Dis. Child 61: 99 (1941).
8. Cerrutti, J. P.; Jaccottet, M. and Wuillerset, B.: Anémie hémolytique immunologique par auto-anticorps. Helv. paediat. Acta. 13: 131 (1958).
9. Coma, Gaglio and Castellani: Un cas de polyradiculonévrite curable (syndrome de Guillain et Barré). Rev. neurol. 69: 708 (1938).
10. Dacie, J. V.: The haemolytic anaemias (Churchill, London 1954).
11. Dacie, J. V.: The haemolytic anaemias, part 2, pp. 690, 586 (Churchill, London 1962).
12. Dacie, J. V. and Gruchy, G. C. de: Auto-antibodies in acquired haemolytic anaemia. J. clin. Path. 4: 253 (1951).
13. de Morsier, G. and Steinmann, J.: Les polyradiculonévrites; forme aiguë curable, forme à évolution fatale. Presse méd. 44: 1890 (1936).

14. Dreyfus, B.; Dausset, J. and Vidal, G. Etude clinique et hématologique de douze cas d'anémie hémolytique acquise avec auto-anticorps. Nouv. Rev. franç. Hémat. 6: 349 (1951).
15. Haymaker, W. and Kernohan, J. W. Landry-Guillain-Barré syndrome: clinicopathologic report of 50 fatal cases and critique of literature. Méd. prat. 28: 59 (1949).
16. Jayle, M. F.; Boussier, G. and Badin, M. J.: Relations entre le taux de l'haptoglobine, celui des globulines 2 et des mucopolysaccharides circulants en pathologie. C.R. Soc. Biol. 149: 46 (1955)
17. Langley, G. R.; Owen, J. A. and Padanyi, R.: The effect of blood transfusions on serum haptoglobin. Brit. J. Haemat. 6: 222 (1960).
18. Leeuw, H. C. A. and Foo, M. Acute polyradiculitis. Acta med. scand. 115: 117 (1943).
19. Marduel, A. A. Horse serum neuropathy. Bull. Soc. Path. exot. 23: 149 (1958)
20. Melnick, S. C. Thirty-eight cases of Guillain-Barré syndrome: an immunological study. Brit. med. J. 1: 368 (1963).
21. Palmer, K. N. V. Polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) treated with 6-mercaptopurine. Lancet 1: 773 (1963).
22. Parsonage, M. J. and Turner, J. W. A. Neuralgic amyotrophy; shoulder-girdle syndrome. Lancet 1: 973 (1948).
23. Pette, E. and Pette, H.: Zur Ätiopathogenese der Entmarkungsencephalomyelitis (einschließlich der akuten multiplen Sklerose) und der Polyneuritis. Klin. Wschr. 34: 713 (1956).
24. Polan, C. G. and Baker, A. B. Encephalomyeloradiculitis. J. nerv. ment. Dis. 96: 508 (1942)
25. Richmond, J.; Woodruff, M. F.; Cumming, R. A. and Donald, K. W. A case of idiopathic thrombocytopenia and autoimmune haemolytic anaemia treated with thymic irradiation and by administration of imuran and actinomycin C. Lancet 2: 125 (1963).
26. Schwartz, R. and Dameshek, W. The treatment of autoimmune haemolytic anaemia with 6-mercaptopurine and thioguanine. Blood 19: 483 (1962).
27. Waksman, B. H. and Adams, R. D. Allergic neuritis: experimental disease of rabbits induced by injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. J. exp. Med. 102: 213 (1955).
28. Waksman, B. H. and Adams, R. D. Symposium on peripheral neuropathies; comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse. J. Neuropath. exp. Neurol. 15: 293 (1956).
29. Wagoner, T. R. Acquired haemolytic jaundice in woman previously splenectomized for essential thrombocytopenia. Folia haemat., Lpz. 48: 248 (1932).
30. Young, L. E.; Miller, G. and Christian, R. M. Clinical and laboratory observations on autoimmune hemolytic disease. Ann. intern. Med. 35: 507 (1951)

Authors' address: Dr. F. A. Ala and Dr. D. J. C. Shearman, Department of Therapeutics, The Royal Infirmary, *Edinburgh* (Great Britain)

Varia

Jean Julliard Prize

The second Jean Julliard Prize so named in commemoration of the 1st Secretary General of the International Society of Blood Transfusion, is intended to encourage research work on Blood Transfusion. It will be awarded during the XIth International Congress of Blood Transfusion to be held in Sydney (Australia) from the 24th to the 29th August 1966.

Candidates, under the age of 35 years, should forward, at least 4 months before the opening of the Congress, 4 copies of their unpublished or recently published work to the Secretary General, Dr J P Soulier, 6 rue Alexandre Cabanel, Paris 15e (France)

The jury for this prize, whose value is sFr 2000.– is composed of Dr. E. Freiesleben (President); Dr S. T Gibson and Dr M. Grove-Rasmussen.

Alfred Piney

1896—1965

Dr Alfred Piney well known internationally for his many contributions to haematological literature died on October 16th, 1953, at the age of 69 years. He had been ailing for some time and his friends missed his company

Forty years ago, he was director of the Institute of Pathology at Charing Cross Hospital and later took charge of the Department of Pathology at the Cancer Hospital. In 1926 he gave the Arris and Gale lecture at the Royal College of Surgeons on 'The importance of haematology in surgery' As clinical medicine attracted him rather more than pathology he became physician at St. Mary's Hospital, Plaistow but he continued with forensic pathology in North London.

He wrote many papers in many journals and several books, 'Handbook of diseases of the blood' 'Recent advances in haematology' 'Clinical Atlas of blood diseases' with S. Wyard, and 'Sternal puncture' with J. L. Hamilton-Paterson. Some of them ran to several editions.

Dr Piney was close friend of Paul Chevallier, and with him was one of the founders of the European Society of Haematology in 1947 He spoke French and German like a native and Italian and Spanish fairly well, and translated several books into English. He was popular person at the meetings and congresses he attended, was widely read and a most story-teller with a quick and incisive wit. This must have enabled him to face several serious illnesses during the last few years, when he was devotedly looked after by his wife Dorothy and encouraged by his sons.

Alfred Piney was fine physician, famous haematologist, polished linguist and attractive personality well rounded, remarkable character His family and his many friends and colleagues will miss him.

E. Neumark, London

Index rerum ad Vol. 34

Bearbeitet von G. B[illegible], Basel

(B) = Buchbesprechungen – Livres nouveaux – Book reviews

Absorption (vitamin K) v Hypoprothrombinaemia

Acquired idiopathic hypoprothrombinaemia v Hypoprothrombinaemia

Adsorption, v Desorption, Plasmaproteinfilm

Advances, v Progress

Agar-gel electrophoresis, Myeloma-proteine

Agglomerated erythrocytes, v Widerstand, elektrischer

Anaemia, Cooley's anaemia the thalassaemia syndromes (V Cooley's anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291

Anaemia, haemolytic, autoimmune case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and Landry Guillain-Barré syndrome, 361

Anaemia, mediterranean, v Thalassemia, β-Thalassaemia

Anaemia perniciosa, v Perniciosa-Kranke

Antibiotica, Chloramphenicol

Antibodies, Rh-incompatibility

Antibodies (autoantibodies) v Thrombocytopenia

Anticorps, v Antibodies

Antikörper v Antibodies

Autoantibodies, v Thrombocytopenia

Autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré syndrome, case, 361

Autoimmune hämolytische Krankheit, Stoffwechselveränderungen in Erythrocyten, 88

Barré, v Landry

Beta-thalassaemia; cytochemical observations on β-thalassaemia (I. The PAS positive substance of erythroblasts) 1

Bleiintoxikation hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation, 338
– v Heavy metals

Blei, radioaktives, v Heavy metals

Blood coagulation, laboratory methods, 127 (B)

Blood coagulation, v Haemophilia, Hypoprothrombinaemia, Streptokinase therapy Thrombocytopenia

Blood groups, v Rh-incompatibility

Blood transfusion; XIth congress of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966) 64, 178

Blood Transfusion, International Society Jean Julliard prize, 570

Blutplättchen, v Thrombocytopenia, Thrombocytopoese

Blutvolumen die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116

Body irradiation (partial), v Typhoid vaccine

Bone marrow human, during the last three months of intrauterin life (A histological study) 228

Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose

C^{14} v Erythrämie

Caillot, lyse, Streptokinase therapy

Chediak-Higashi-Steinbrinck syndrome, four cases, histochemical and genetic studies, 20

Chloramphenicol and erythropoiesis, 321

Chromatographie, Papier-Chromatographie, v Porphyrinsynthese
Chromium, radioactive, v Erythrocytenmenge, Osteomyelofibrose
Chromosome complement in some myeloproliferative disorders, Investigations, 36
Clot dissolution, v Streptokinase therapy
Coagulation of blood, v Haemophilias, Hypoprothrombinaemia, Laboratory methods, Streptokinase therapy Thrombocytopenia
Cold-labile proteins, Serumkomponenten
Conductibility v Erythrocyten, gepackte
Congenital familial methaemoglobinaemia, v Kongenitale Methämoglobinämie
Congress, XIth, of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966), 64, 128
Congress, XIth, of the International Society of Haematology (Sydney 1966) 64, 128
Cooley's anaemia; the thalassaemia syndromes (V: Cooley' anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291
Cr^{51} v Erythrocytenmenge, Osteomyelofibrose
Cryolabiles, protéines cryolabiles, v Serumkomponenten
Cyanocobalamin, v Perniciosa-Kranke
Cytochemical and genetic studies in four cases of Chediak-Higashi-Steinbrinck syndrome, 20
Cytochemical observations on β-thalassaemia (I: The PAS positive substance of erythroblasts) 1
Cytochemistry v Erythrocyte enzymes, Hämolytische Krankheit, Hämolytische Krise, Phosphatases, Tetrahydrofolic acid.
Desorption of some toxic heavy metals from human erythrocytes in vitro, 101
Diagnostic and therapeutic problems in severe renal failure, 233 (B)
Diphorasemangel; eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diphorasemangels, 215
Difformités, v Mongolisme
Di Guglielmo syndrome, v Erythrémie
Drepanocytosis; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassodrepanocytosis, 329
– v Sickling phenomenon
Dysproteinämien Untersuchungen über kältelabile und wärmelabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien, 160
–; v Makroglobuline
Eisen, v Haemsynthese, Osteomyelofibrose, Ozaena
Elektrischer Widerstand; die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich, 51
Electron microscope, v Erythrémie
Electrophoresis; agar-gel electrophoresis, Myeloproteins
Electrophoresis, paper electrophoresis, v Myeloproteins
Electrophoresis, starch gel electrophoresis, v Haemoglobin E, Sickling phenomenon, Thalassaemia
Embryo (human), v Bone marrow
Enfants mort-nés, v Human bone marrow Rh-incompatibility
Enzyme system; studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
Enzymes; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassodrepanocytosis, 329
Erythrémie altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myélose érythrémique aiguë, 277
Erythroblastes altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myélose érythrémique aiguë, 277
–; the PAS positive substance of erythroblasts (Cytochemical observations on β-thalassaemia I.) 1
Erythroblastosis foetalis, v Rh-incompatibility
Erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassodrepanocytosis, 329
Erythrocyten Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten, 299
Stoffwechselveränderungen in Erythrocyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit, 88

–; Untersuchungen über die Haemsynthese in roten Blutzellen. (I.: Die Bildung von Fe^{59} Haemoglobin in Haemolysaten und Suspensionen aus Kaninchenretikulozyten. Anwendung einer Präzipitationsmethode zur Isolierung des Haemeisens) 193
Erythrocyten, gepackte: die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich, 51
Erythrocytenkinetik, v Osteomyelofibrose
Erythrocytenmenge, zirkulierende; die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116
Erythrocytes: altérations érythroblastiques et érythrocytaires dans la myélose érythrémique aiguë, 277
Erythrocytes, human; desorption of some toxic heavy metals from human erythrocytes *in vitro* 101
– v Sickling phenomenon
Erythroleukaemia, v Erythrémie
Erythropoiesis and chloramphenicol, 321
Erythropoiesis, v Osteomyelofibrose
Experimental tumor research, progress (Vol. 5; Vol. 6) 255 (*B*)
Falciformes, érythrocytes falciformes, v Drepanocytosis, Sickling phenomenon
Familial chronic thrombocytopenia with platelet autoantibodies, 30
Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorasemangels, 215
Families with Chédiak-syndrome, Chédiak
Families, v Thalassaemia
Fe^{59} v Haemsynthese, Osteomyelofibrose
Feinstruktur v Erythrémie
Fer v Haemsynthese, Osteomyelofibrose, Ozaena
Ferments; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassodrepanocytosis, 329
– studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
–; v Diaphorasemangel, Glukose-6-phosphatdehydrogenase, Hämolytische Krankheit, Haemsynthese, Myeloproteine, Phosphatases, Porphyrinsynthese
Ferrokinetik, v Osteomyelofibrose
Fetal haemoglobin, v Thalassaemia
Fibrinogerinnsel, Auflösung, v Streptokinase therapy
Film, v Plasmaproteinfilm
Foetal haemoglobin, v Thalassaemia
Foetus (human) v Bone marrow
Gamma-globulin therapy substitutive-inhibitory as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
Gamma-G-globulin; metabolism of γG-globulin in chronic leukaemia, 44
Genetic and histochemical studies in four cases of Chédiak, Higashi-Steinbrinck syndrome, 20
Genetics, Haemoglobin E, Porphyrinsynthese, Sickling phenomenon, Thalassaemia, β Thalassaemia
Gesellschaften, v Society
Gewervelde dieren (~ *Vertebrate*) v Granulocyten
Globules rouges, v Erythrocyten, Erythrocytes
Globulin metabolism of γG-globulin in chronic leukaemia, 44
Globulin, v Gamma-globulin therapy
γ-Globulin, v Gamma-globulin therapy
γG-globulin, v Gamma-G-Globulin
Globuline, v Makroglobuline
Glukose-6-phosphatdehydrogenase; hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Bleiintoxikation, 338
Glykoproteide, v Myeloproteine
Granulocyten; bijdrage tot de kennis van de morfologie van de granulocyten bij de mens en de gewervelde dieren (Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der Granulocyten beim Menschen und bei den Wirbeltieren), 250 (*B*)
Granulocytes, neutrophil (anomal granulation) v Chédiak
Grossesse, v Human bone marrow
Günthersche Porphyria congenita, Störung der Porphyrinsynthese, 63
Guillain, v Landry

Haematology: XIth congress of the International Society of Haematology (Sydney 1966), 64, 128
Haematology of some South African Reptiles, 250 (B)
Hämatokrit, v Erythrocyten, gepackte
Haemoglobin, v Methämoglobinämie
Haemoglobin (Fe^III-Hämoglobin) v Haemsynthese
Haemoglobin E further example of thalassaemia – haemoglobin E disease in Turkey 354
Haemoglobin, fetal, v Thalassaemia
Haemoglobin S; the sickling phenomenon in white male without Hb-S 347
Haemoglobinopathy v β-Thalassaemia
Haemolytic anaemia, autoimmune; case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré syndrome, 361
Haemolytische Krankheit, autoimmune Stoffwechseluntersuchungen in Erythrocyten, 88
Hämolytische Krise bei Mangel an Glukose-6-phosphatdehydrogenase und Rhinitisvaccination, 338
Haemophilias (International symposium) 127 (B)
Haemorrhagic diathesis, v Hypoprothrombinaemia
Haemorrhagy v Thrombocytopenia
Haemsynthese in roten Blutzellen, Untersuchungen (I. Die Bildung von Fe^III-Hämoglobin in Haemolysaten und Suspensionen aus Kaninchenretikulocyten. Anwendung einer Präzipitationsmethode zur Isolierung des Haemoglobins), 193
; Porphyrinsynthese
Hb-S the sickling phenomenon in white male without Hb-S, 347
Hb E; a further example of thalassaemia-haemoglobin E disease in Turkey 354
Heavy metals, toxic, desorption from human erythrocytes in vitro, 101
Hématies, v Erythrocyten, Erythrocytes
Hémolyse par autoimmunisation, v Hämolytische Krankheit
Hemophilias (International symposium) 127 (B)
Heredopathy v Cerebral Haemoglobin E, Methämoglobinämie, Porphyria congenita, Sickling phenomenon, Thalassaemia, β-Thalassaemia, Thrombocytopenia
Hg^203 v Heavy metals
Hirnblut- v Cerebral
Histochemistry v Cerebral- Erythrocyte enzymes, Hämolytische Krankheit, Hämolytische Krise, Phosphatasen, Tetrahydrofolic acid, β Thalassaemia
Hormone, v Granulocyten
Human bone marrow during the last three months of intrauterin life (A histological study) 228
Human erythrocytes, Erythrocytes, human
Human leukocytes, v Granulocytes Leukocytes, human
Hydrolabiles, protéines hydrolabiles, v Serumkomponenten
Hypoprothrombinaemia, acquired, idiopathic (Acquired hypoprothrombinaemia secondary to selective deficient absorption of vitamin K), 167
Idiopathic acquired hypoprothrombinaemia, v Hypoprothrombinaemia
Immune tolerance, disorders, Autoimmune haemolytic anaemia
Immunkörper v Autoimmune hämolytische Krankheit
International Society of Blood Transfusion, XIth congress (Sydney 1966), 64 128
–; Jean Julliard prize, 370
International Society of Haematology XIth congress (Sydney 1966) 64 128
Intoxication, Rhinitisvaccination, Heavy metals
Intrauterine life human bone marrow during the last three months of intrauterin life (A histological study), 228
Iron, Haemsynthese, Osteomyelofibrose
Iron deficiency; oedema, manifestation of iron deficiency 127 (B)
Irradiation; the effect of typhoid vaccine injection of partial body irradiated rats, 301
Isomerase, Porphyrinsynthese

Isotope, radioaktive, v Erythrämie, Erythrocytenmenge, Haemsynthese, Heavy metals, Osteomyelofibrose
JULLIARD, JEAN, prize, 370
Kältelabile Serumkomponenten, Serumkomponenten
Kidney v Renal failure
Knochenmark, v Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
Kongenitale Methämoglobinämie, familiäre infolge Diaphorasemangels, 215
Kongenitale Porphyrie (GÜNTHER) v Porphyrinsynthese
Kongress, v Congress
Labilitätsphänomene, v Serumkomponenten
Laboratory methods in blood coagulation, 127 (B)
LANDRY-GUILLAIN-BARRÉ syndrome: case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and LANDRY-GUILLAIN-BARRÉ syndrome, 361
Lead poisoning, v Bleiintoxikation
Lead, radioactive, poisoning, v Heavy metals
Leitfähigkeit gepackter Erythrocyten, v Widerstand, elektrischer
Leukaemia, chronic, metabolism of γG-globulin, 44
Leukaemia, v Myeloproliferative disorders
Leukaemic and normal leukocytes, v Leukocytes, human, normal and leukaemic
Leukocyten, Granulocyten
Leukocytes les phosphatases leucocytaires alcalines et acides Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques, 129
Leukocytes, human, normal and leukaemic studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
Leukopenia (after partial body irradiation) v Typhoid vaccine
Libri, 127 250–255
Lymphocytes, v CERNIAK-
Makroglobuline und Myelomproteine, Charakterisierung, 144
– v Paraproteinämien
Man, v Granulocytes, Human bone marrow
Mediterranean anaemia, v Thalassaemia, β-Thalassaemia
Medulla ossium, v Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
Megaloblastäre Anämie, v Perniciosa-Kranke
Membran der Erythrocyten, v Erythrocyten, gepackte; Heavy metals
Mens (= Mensch), v Granulocyten
Mensch, v Granulocyten
Mercury radioactive, v Heavy metals
Metabolism of γG-globulin in chronic leukaemia, 44
Metabolismus, v Stoffwechselveränderungen
Metals, heavy toxic, v Heavy metals
Methämoglobinämie, kongenitale familiäre, infolge Diaphorasemangel, 215
Methode, v Haemsynthese, Plasminogen
Methods laboratory methods in blood coagulation, 127 (B)
Microscope électronique, v Erythrämie
Missbildungen, v Mongolism
Mitoses, v Chloramphenicol, Erythrämie
Moelle osseuse, Bone marrow Chloramphenicol, Erythrämie, Myeloproliferative disorders, Osteomyelofibrose
Mongolisme étude clinique de 134 mongoliens, 127 (B)
Mort fœtale, v Human bone marrow Rh-incompatibility
Myelomproteine und Makroglobuline, Charakterisierung, 144
–, v Paraproteinämien
Myeloproliferative disorders investigations on the chromosome complement in some myeloproliferative disorders, 36
Myélose érythrémique altérations érythroblastiques érythrocytaires dans la myélose érythrémique aiguë, 277
Necrologia, 370
Neugeborene, v Human bone marrow
Neutrophil granulocytes, CERNIAK –
New-born, Human bone marrow
Niederfrequenter Bereich, v Erythrocyten, gepackte
Niere, v Renal failure

Normoblasts, v Erythroblasts
Normoran-cells, Human bone marrow
Oberfläche menschlicher Erythrocyten, Plasmaproteinfilm, 239
Erythrocyten, gepackte Heavy metals
Osteoporosis, Human bone marrow
Osler Vaquez, morbus- Polycythaemia vera
Osteomyelofibrose (Untersuchung der Ferro- und Erythrocytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom) 257
Oxaena, manifestation of iron deficiency 127 (B)
Paper electrophoresis, v Myeloproteine
Paraproteinämien; Untersuchungen über hitzlabile und wasserlabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien, 160
v Makroglobuline
PAS positive substances in erythroblasts (Cytochemical observations on β-thalassaemia I) 1
Pb, v Bleiinsufflation
Pb^{210} Heavy metals
Periodic acid Schiff (= PAS) reaction, PAS positive substances
Perniciosa Kranke, Untersuchung der Thrombocytopoese, 175
Phosphatases leucocytaires alcalines et acides: Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques, 129
Porry Alfred (1896–1965) 371
Plaquettes sanguines, v Thrombocytopenia, Thrombocytopoese
Plasma les phosphatases leucocytaires alcalines et acides Variations pathologiques, régulation humorale et rapports avec les phosphatases plasmatiques, 129
Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten, 239
Plasminogen; technique for routine evaluation of plasminogen in humans during streptokinase therapy 305
Plasmocytoma, Myeloproliferative disorders
Platelets, Thrombocytopenia, Thrombocytopoese
Plumb, intoxication, Bleiinsufflation
Plomb, radioactive, intoxication, v Heavy metals
Polycythaemia vera; die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116
Polyglobulien; die Indikation zur Bestimmung von Blutvolumen und zirkulierender Erythrocytenmenge bei Polycythaemia vera und Polyglobulien, 116
Porphyria congenita (Günther) Störung der Porphyrinsynthese bei der Günther'schen Porphyria congenita, 65
Porphyrinsynthese, Störung bei der Günther'schen Porphyria congenita, 65
Pregnancy v Human bone marrow
Präzipitationsmethode (Mrazek) v Haemosynthese
Prize; Jean Julliard prize, 370
Progress in experimental tumor research (Vol. 5 Vol. 6) 255 (B)
Proteinfilm; Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten, 239
Proteine, Globulin, Myeloproteine, Serumkomponenten
Prothrombin, v Hypoprothrombinaemia
Purpura, thrombocytopenic, idiopathic, (familial), v Thrombocytopenia
Quecksilber radioaktives, v Heavy metals
Radiation, v Typhoid vaccine
Radio-Blei (Radio-Quecksilber Radio-Thallium), v Heavy metals
Radiocarbon, v Erythrämie
Radiochrom, v Erythrocytenmenge, Osteomyelofibrose
Radioeisen, v Haemosynthese, Osteomyelofibrose
Radio-Quecksilber Heavy metals
Radio-Thallium, v Heavy metals
Rat, Typhoid vaccine
Raynes X, v Typhoid vaccine
Red cells, v Erythrocyten, Erythrocytes
Rein, v Renal failure

Renal failure therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure, 235 (β)
Reptiles haematology of some South African reptiles, 250 (β)
Résistance électrique, v Widerstand, elektrischer
Resorption (Vitamin K), v Hypoprothrombinaemia
Retikulocyten (Kernkugelretikulocyten) v Haemsynthese
Rh-incompatibility substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
Riesengranulationen, erblich-konstitutionelle, v Chediak-
Röntgenstrahlen, v Typhoid vaccine
Schwangerschaft, Human bone marrow
Schwermetalle, toxische, v Heavy metals
Serumkomponenten Untersuchungen über kältelabile und wasserlabile Serumkomponenten bei Paraproteinämien und Dysproteinämien, 160
–; v Makroglobulins
Sickling phenomenon in white male without Hb-S, 347
Drepanocytosis
Society XIth congress of the International Society of Blood Transfusion (Sydney 1966), 64
– International, of Blood Transfusion, v Jean Julliard prize
–; XIth congress of the International Society of Haematology (Sydney 1966), 64
South Africa haematology of some South African reptiles, 250 (β)
Starch gel electrophoresis, v Haemoglobin E, Sickling phenomenon, Thalassaemia
Statistische Auswertung, v Chloramphenicol, Erythrocyte enzymes, Erythrocytenmenge, Hämolytische Krankheit, Human bone marrow Phosphatases
Steinbrinck- v Chediak-
Stillbirth substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
Stillborn children, v Human bone marrow
Stoffwechsel, v Metabolism
Stoffwechselveränderungen in Erythrocyten bei der autoimmunen hämolytischen Krankheit, 88
Strahlenwirkung, v Typhoid vaccine
Streptokinase therapy technique for routine evaluation of plasminogen in humans during streptokinase therapy 305
Subelectronmicroscopical structure, v Erythraemie
Surface of erythrocytes, v Erythrocytes, gepackte; Heavy metals [illegible]
Symposium, v Haemophilia
Synthese des Porphyrins, v Porphyrinsynthese
Technique for routine evaluation of plasminogen in humans during streptokinase therapy 305
Teratologie, v Mongolism
Tetrahydrofolic acid studies on the tetrahydrofolic acid dependent enzyme system in human leukocytes, 72
Thalassaemia; erythrocyte enzymes in thalassaemia and thalassodrepanocytosis, 329
β-Thalassaemia; cytochemical observations on β-thalassaemia (I.: The PAS positive substance of erythroblasts), 1
Thalassaemia-haemoglobin E disease in Turkey a further example, 154
Thalassaemia syndromes (v Cooley' anaemia with low level of fetal haemoglobin. A genetic study in four families) 291
Thalassodrepanocytosis, v Thalassaemia
Thallium, radioactive v Heavy metals
Therapeutic and diagnostic problems in severe renal failure, 235 (β)
Therapy streptokinase therapy; technique for routine evaluation of plasminogen during streptokinase therapy 305
–; substitutive-inhibitory gamma-globulin therapy as prevention of stillbirth in Rh-incompatibility 209
Thrombocytopenia; a case of autoimmune haemolytic anaemia, throm-

bocytopenia and Landry Guillain-Barré syndrome, 361
Thrombocytopenia, familial, chronic, with platelet autoantibodies, 80
Thrombocytopoese bei Perniciosa-Kranken, Untersuchung, 175
Thrombus, Auflösung, v Streptokinase therapy
Tl²⁰⁴ v Heavy metals
Totgeburten, v Human bone marrow Rh-incompatibility
Toxic heavy metals, v Heavy metals
Transfusion, v Blood transfusion
Tumor research, experimental, progress, (Vol. 5, Vol. 6), 255 (B)
Turkey: further example of thalassemia-haemoglobin E disease in Turkey 334
Typhoid vaccine injection, effect of partial body irradiated rats, 301
Ultrastructure, v Erythrémie
Vaccine; effect of typhoid vaccine injection of partial body irradiated rats, 301
Vaquez, v Osler
Varia, 64, 127 370
Vertebrates, v Granulocyten
Vitamin B_{12}, Perniciosa-Kranke
Vitamin K; acquired idiopathic hypoprothrombinaemia (Acquired hypoprothrombinaemia secondary to selective deficient absorption of vitamin K) 187
Waldenström's, morbus- v Makroglobuline, Paraproteinämien
Wasserlabile Serumkomponenten, Serumkomponenten
Water-labile proteins, v Serumkomponenten
White male without Hb-S, sickling phenomenon, 347
Widerstand, elektrischer: die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrocyten im niederfrequenten Bereich, 51
Wirbeltiere, v Granulocyten
X-rays, v Typhoid vaccine
Zentrifuge, v Erythrocyten, gepackte

Index autorum ad Vol. 34

(B) — Buchbesprechungen – Livres nouveaux – Book reviews

Ader H., v Sadan, N.
Aksoy M., and Erdem, S., 291
Ala, F A., and Shearman, D. J. C., 361
Alwall, N., 255 (B)
Andersen, St. B., 44
Antonioli, J A., Baer A., et Vannotti A., 129
Arcasoy A., v Okçuoğlu, A.
Bachmann, F Frick, P G.
Baer A., v Antonioli, J A.
Barbier F 250 (B)
Belfiore, F Meldolesi, J and Calcara, G., 329
Bell, W N., Thompson, R. B.
Bernát, L, 127 (B)
Bicanová, J Brabec, V
Brabec, V Bicanová, J Friedmann, B., Kout, M., Mirčevová, L., Pálek, J Vopatová, M., and Volek, V 68
Brinkhous, K. M. (Editor), 127 (B)
Brunner H. E., 237
Burgess, W v Kleine, N.
Buscarini, L., Introzzi, P
Calcara, G., Belfiore, F
Carrera, P M., v Pozzi, G. B.
Cataldo, F de, v de Cataldo, F
Clotten, R., v Heilmeyer L.
Clotten, R., Heimpel, H.
Colonna, A., Grignani, F
Cserháti, I. Rák, K.
de Cataldo, F 187
de Villiers Pienaar U 250 (B)
de Vries R. A., 305
de Wolff, E., Wolff, E. de
Efrati, P Sadan, N.
Eichelberger J. W Jr 127 (B)
Emery J. L., Kalpaktsoglou, Pitsa K.
Erdem, S., Aksoy M.

Erldani, S., v Ponti, G B.
Fessas, Ph., and Papayannopoulou, Thalia, 1
Frick, P 127 (B)
Frick, P G., Bachmann, F und Schmid, J R., 215
Friedmann, B. v Brabec, V
Gamzoni, A., und Rhomberg, F 338
Gloor F., 255 (B)
Götz, H., v Scheiffarth, F
Gorini, P v Rondanelli, E. G
Gramlich, F v Müller H. E.
Grignani, F Martelli, M., Tonato, M., and Colonna, A., 72
Harms, D and Sachs, V 90
Heilmeyer L., und Clotten, R., 65
Heilmeyer L., Heimpel, H.
Heimpel, H., Clotten, R., und Heilmeyer L., 193
Hochman, A., Robinson, E.
Homburger F (Editor) 255 (B)
Huber H., Lewis, S. M., und Szur L., 116
Introzzi, P Boscarini, L., et Notario, Antonia, 277
Kalpaktsoglou, Pitsa K., and Emery J L., 228
Kleine, N und Borgaes, W 51
Klemm, D v Schubothe, H.
Kout, M., Brabec, V
Krizsa, F Rák, K.
Lewis, S. M., Huber H.
Lutz, H., Scheiffarth, F
Magfiulo, E., Rondanelli, E. G
Martelli, M., Grignani, F
Meldolesi, J Belfiore, F
Minnich, Virginia, Okçuoğlu, A.
Mirčevová, L., v Brabec, V
Müller H. E. und Gramlich, F 239
Neumark, E., 371
Notario, Antonia, Introzzi, P
Odom, J Thompson, R. B.
Okçuoğlu, A., Minnich, Virginia, and Arcasoy A., 354
Palek, J v Brabec, V
Papayannopoulou, Thalia, Fessas, Ph.
Pienaar U de Villiers, de Villiers Pienaar U
Ponti, G B., Valentini, R., Carrara, P M., and Erldani, S., 36
Raju, S., v Schubothe, H.
Rák, K., Krizsa, F Varga, L., and Cserhátí, I., 175
Rau, P J v Thompson, R. B.
Rewald, E., and Suringar F 209
Rhomberg, F v Gamzoni, A.
Robinson, E., and Hochman, A., 301
Rondanelli, E. G., Gorini, P and Magfiulo, E., 321
Rosenow G., 127 (B)
Rozenszajn, L., v Sadan, N
Sachs, V v Harms, D
Sadan, N., Yaffe, D Rozenszajn, L., Adar H., Soroker B., and Efrati, P 20
Scheiffarth, F Götz, H., und Lutz, H. 144
Schmid, J R., Frick, P G
Schubothe, H., Raju, S., und Klemm, D 160
Shearman, D J. C., v Ala, F A.
Soroker B., Sadan, N
Stalder G 127 (B)
Suringar F v Rewald, E.
Szur L., v Huber H.
Thölen, H., 255 (B)
Thompson, R. B., Rau, P J Odom, J., and Bell, W N 347
Tonato, M., v Grignani, F
Undritz, E., 250 (B)
Valentini, R., v Ponti, G. B.
Vannotti, A., v Antonioli, J A.
Varga, L., v Rák, K.
Villiers Pienaar U de, de Villiers Pienaar U
Volek, V., Brabec, V
Vopatová, M., Brabec, V
Vreker R. A. de, v de Vreker R. A.
Wirschl, H., 101
Wolff, Emanuelle de, 127 (B)
Yaffe, D., Sadan, N